

**Untersuchung der viruziden Eigenschaften von Feststoffpartikeln in
Suspension gegenüber verschiedenen Modellviren**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Frederik Pfaff

geboren am 25.10.1991 in Bad Homburg v.d.H.

Gutachter:

1. Prof. Dr. Roland Zell, Jena
2. Prof. Dr. Wolfgang Pfister, Jena
3. Prof. Dr. Holger F. Rabenau, Frankfurt/Main

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.01.2017

Examen: 14.11.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Viruzidietestung von Desinfektionsmitteln	3
2.1.1 Bedeutung und Entwicklung auf nationaler und internationaler Ebene	3
2.1.2 Der quantitative Suspensionsversuch	4
2.2 Bedeutung viraler Erkrankungen – Weltweit und in Deutschland	5
2.3 Übertragungswege von Viren und Interventionsmöglichkeiten	7
2.3.1 Intervention durch neue Methoden der Flächendesinfektion	8
2.3.2 Intervention durch etablierte Desinfektionsmittel	8
2.4 Modellviren	9
2.4.1 Auswahl verwendeter Modellviren	9
2.4.2 Taxonomie, Aufbau und Chemoresistenz verwendeter Modellviren	10
2.4.2.1 Modifiziertes Vacciniavirus, Stamm Ankara	10
2.4.2.2 Humanes Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75	12
2.4.2.3 Poliovirus Typ 1, Stamm LSc-2ab, Sabin	13
2.4.2.4 Murines Norovirus, Stamm S99	15
2.5 Nanopartikel	16
2.5.1 Definition	16
2.5.2 Allgemeine Eigenschaften und Reaktionsverhalten	16
2.5.3 Risikopotenzial	17
2.6.4 Medizinische Anwendung	18
3 Ziele der Arbeit	20
4 Material und Methoden	21
4.1 Geräte, Material und Chemikalien	21
4.2 Lösungen und Puffer	23
4.3 Zellkultur	23
4.3.1 <i>“Baby Hamster Kidney”</i> - BHK-21	23
4.3.2 <i>“Human Lung Carcinoma Cell Line”</i> - A-549	24
4.3.3 <i>“Monkey African Green Kidney”</i> - BGM	24
4.3.4 <i>„Murine Macrophage Cell Line“</i> - RAW 264.7	24
4.3.5 Vermehrung der Zellkulturen	25
4.4 Modellviren	27
4.4.1 Modifiziertes Vacciniavirus, Stamm Ankara	27
4.4.2 Humanes Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75	27
4.4.3 Poliovirus Typ 1, Stamm LSc-2ab, Sabin	27
4.4.4 Murines Norovirus, Stamm S99	28
4.4.5 Virusvermehrung	28

4.5 Testsubstanzen	30
4.5.1 Silizium-Nanostrukturen (IPHT, Jena)	30
4.5.2 Wolframcarbid-Nanopartikel (IKTS, Hermsdorf)	32
4.5.3 Formaldehyd	35
4.6 Quantitativer Suspensionsversuch	36
4.6.1 Durchführung	36
4.6.2 Bestimmung der Infektiosität	37
4.6.3 Kontrollversuche	38
4.6.4 Statistische Auswertung	39
4.7 Lichtmikroskopie	41
4.8 <i>Quantitative Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction</i>	41
4.8.1 Grundlagen	41
4.8.2 Probengenerierung	42
4.8.3 Weiterverarbeitung der Proben	44
4.8.4 Durchführung der Messung	46
5 Ergebnisse	47
5.1 Quantitativer Suspensionsversuch	47
5.1.1 Bewertung der Kontrollversuche	47
5.1.2 Silizium-Nanostrukturen (IPHT, Jena)	51
5.1.2.1 Si1 (mesoporöse SiNPs + PBS (1:16)), 0,8 mg/ml	51
5.1.2.2 Si2 (mesoporöse SiNPs + PBS (1:1) autoklaviert), 4,0 mg/ml	51
5.1.2.3 Si3 (SiNWs + PBS (1:1)), 0,32 mg/ml	53
5.1.2.4 Si4 (SiNWs + PBS (1:1) autoklaviert), 0,32 mg/ml	53
5.1.2.5 Wirkstoffvergleich - Silizium-Nanostrukturen	53
5.1.3 Wolframcarbid-Nanostrukturen (IKTS, Hermsdorf)	55
5.1.3.1 WC1 = WC 3530 Riga, 100 mg/ml	55
5.1.3.2 WC2 = WC Riga 6, 100 mg/ml	58
5.1.3.3 WC3 = Aviro-OC-01/13, 100 mg/ml	61
5.1.3.4 WC4 = 2013-02 J/G/R, 100 mg/ml	63
5.1.3.5 WC5 = W ₂ C/C 08/12, 100 mg/ml	66
5.1.3.6 Wirkstoffvergleich - Wolframcarbid-Nanostrukturen	68
5.1.4 Konzentrationsabhängige Kinetik	69
5.2 <i>Quantitative Real-Time-Polymerase Chain Reaction</i>	73
5.2.1 Eichgerade	73
5.2.2 Quantifizierung aus Proben des Suspensionsversuchs	75
6 Diskussion	78
7 Schlussfolgerungen	90
8 Quellen- und Literaturverzeichnis	91
Danksagung	101
Ehrenwörtliche Erklärung	102

Abkürzungsverzeichnis

A-549	<i>Human Lung Carcinoma Cell Line</i>
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
AVT	Ausgangsvirustiter
BGM	<i>Monkey African Green Kidney</i>
BHK-21	<i>Baby Hamster Kidney</i>
CEN	<i>European Committee for Standardization</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	<i>Cycle-Threshold</i>
DM	Desinfektionsmittel
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Medium Eagle</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotid
DVV	Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V.
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
EN	Europäische Norm
EWZ	Einwirkzeit
FA	Formaldehyd
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Fetales Rinderserum)
HAdV-5	Humanes Adenovirus Typ 5
IKTS	Fraunhofer-Institut für Keramische Technologien und Systeme
IPHT	Leibniz-Institut für Photonische Technologien
KI	Konfidenzintervall
MERS	<i>Middle East Respiratory Syndrome</i>
MNV	Murines Norovirus
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MVA	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
p.i.	post infectionem
PV-1	Poliovirus Typ 1
q-RT-PCR	<i>quantitative Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction</i>
RAW 264.7	<i>Murine Macrophage Cell Line</i>
RF	Reduktionsfaktor
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
RVT	Restvirustiter
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
SiNPs	<i>Silicon-Nanoparticles</i>
SiNWs	<i>Silicon-NanoWires</i>
TCID	<i>Tissue Culture Infective Dose</i>
UZ	Ultrazentrifugation
VK	Viruskontrolle
VP	Virusprotein
WC	Wolframcarbide
WHO	<i>World Health Organization</i>
WSH	Wasser standardisierter Härte
ZK	Zellkontrolle
ZKÜ	Zellkulturüberstand
zpE	zytopathischer Effekt
ZT	Zytotoxizitätskontrolle

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Einteilung der Viren nach Lipophilie bzw. Hydrophilie	9
Tab. 2:	Geräte	21
Tab. 3:	Material	22
Tab. 4:	Chemikalien	22
Tab. 5:	Zelllinien mit Angabe verwendeter Passagezahlen	25
Tab. 6:	Zelllinien einschließlich ihrer Passage/ -Kulturbedingungen und Kulturmedien	26
Tab. 7:	Zelllinien einschließlich ihrer Kulturbedingungen sowie Kulturmedien vor und nach Infektion	27
Tab. 8:	Zur Vermehrung verwendete Ausgangsvirussuspensionen	28
Tab. 9:	Zu Testzwecken verwendete Virussuspensionen	30
Tab. 10:	Zur Viruzidietestung verwendete Silizium-Nanostrukturen	32
Tab. 11:	WC-Pulver einschließlich ausgewählter physikalischer Eigenschaften	35
Tab. 12:	Berechnung von Mittelwert und 95 %-KI	40
Tab. 13:	Probenrekrutierung für q-RT-PCR	43
Tab. 14:	Zusammensetzung der q-RT-PCR-Ansätze	45
Tab. 15:	Primerpaar für Enterovirus-PCR	45
Tab. 16:	Verwendetes q-RT-PCR-Protokoll	46
Tab. 17:	Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten Kontrollversuche	48
Tab. 18:	Wirkstoffvergleich zur Identifizierung signifikant unterschiedlicher Wirkstoffbeziehungen	68
Tab. 19:	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse	71
Tab. 20:	Ct-Werte der Standardproben von 10^9 bis 10^2 Kopien/ μ l	74
Tab. 21:	Zusammenfassende und vergleichende Darstellung des Verlaufs von viraler RNA und Virustiter	76

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Variola Major Viren	11
Abb. 2:	Schematischer Aufbau eines Adenovirus-Kapsids	13
Abb. 3:	Struktur der Picornaviren	14
Abb. 4:	Struktur des Norovirus	16
Abb. 5:	Poröses Silizium und kristallines Silizium	31
Abb. 6:	SiNPs und SiNWs	31
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Struktur von WC	33
Abb. 8:	WC Riga 6 und W2C/C 08/12	34
Abb. 9:	Darstellung der ermittelten RF für FA in Abhängigkeit von EWZ und Modellvirus	50
Abb. 10:	Darstellung der ermittelten RF für Si1 gegenüber MVA in Abhängigkeit der EWZ	52
Abb. 11:	Darstellung der ermittelten RF für Si2 gegenüber MVA in Abhängigkeit der EWZ	52
Abb. 12:	Darstellung der ermittelten RF für Si3 gegenüber MVA in Abhängigkeit der EWZ	54
Abb. 13:	Darstellung der ermittelten RF für Si4 gegenüber MVA in Abhängigkeit der EWZ	54
Abb. 14:	zpE in BHK-21-Zellkulturen infiziert mit MVA	56
Abb. 15:	Darstellung der ermittelten RF für WC1 in Abhängigkeit von EWZ und Modellvirus	57
Abb. 16:	zpE in A-549-Zellkulturen infiziert mit HAdV-5	59
Abb. 17:	Darstellung der ermittelten RF für WC2 in Abhängigkeit von EWZ und Modellvirus	60
Abb. 18:	zpE in BGM-Zellkulturen infiziert mit PV-1	62

Abbildungsverzeichnis

Abb. 19: Darstellung der ermittelten RF für WC3 in Abhängigkeit von EWZ und Modellvirus	63
Abb. 20: Darstellung der ermittelten RF für WC4 in Abhängigkeit von EWZ und Modellvirus	64
Abb. 21: zpE in RAW 264.7-Zellkulturen infiziert mit MNV	65
Abb. 22: Darstellung der ermittelten RF für WC5 in Abhängigkeit von EWZ und Modellvirus	67
Abb. 23: Darstellung der ermittelten RF für WC4 gegenüber PV-1 nach 15 min in Abhängigkeit der Konzentration	70
Abb. 24: q-RT-PCR-Lauf/ Eichgerade	74
Abb. 25: Eichgerade	74
Abb. 26: Schmelzkurve/ Eichgerade	75
Abb. 27: q-RT-PCR-Lauf und Schmelzkurve/ Desinfektionsversuch	77

1 Zusammenfassung

Virale Infektionen können einen hohen Krankheitswert haben. Dies zeigt sich insbesondere bei den chronisch verlaufenden Infektionen, welche die Betroffenen in ihrer Lebensführung oft stark einschränken sowie deren Morbidität und Mortalität steigern. Beispielhaft seien hier die chronischen Virushepatitiden oder eine HIV-Infektion genannt, die v.a. mit schweren Langzeitfolgen assoziiert sind. Da nur für wenige ausgewählte Virusinfektionen kausale Therapien auf der Basis antiviraler Medikamente existieren und diese bei einer i.d.R. lebenslang notwendigen Einnahme z.T. erhebliche Nebenwirkungen besitzen, muss aktuell der Schwerpunkt auf der Prävention solcher Infektionen liegen. Hierzu kommen neben Impfungen, welche bei eingeschränkter erregerspezifischer Verfügbarkeit als die am besten wirksame Präventionsmaßnahme gelten, die Hygiene verbessernde Maßnahmen in Betracht. Diese schließen den Einsatz chemischer Desinfektionsmittel (DM) mit ein, die neben bakterizider und fungizider Wirksamkeit auch unter standardisierten Testbedingungen nachgewiesene viruzide Wirksamkeit besitzen müssen.

Da in der Literatur zunehmend mehr Berichte über Nanotechnologie-basierte Stoffe mit virusreduzierender Wirkung zu finden und regional kooperierende Einrichtungen in diese Forschung involviert sind, wurden in der vorliegenden Arbeit neun Proben verschiedener Nanopartikel unter dem Aspekt viruzider Eigenschaften untersucht. Hierbei handelte es sich um Proben aus elementarem Silizium, welche einerseits als *Silicon-Nanoparticles* (SiNPs) mit den Bezeichnungen Si1 und Si2, sowie andererseits als faserähnliche Strukturen, den sogenannten *Silicon-NanoWires* (SiNWs) Si3 und Si4 geprüft wurden. Darüber hinaus waren Nanopartikel aus Wolframcarbid (WC) mit insgesamt fünf Proben von WC1 bis WC5 vertreten. Methodisch kam der quantitative Suspensionsversuch entsprechend der „Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV) und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin“ (Rabenau et al. 2015) sowie unter zusätzlicher Beachtung der Europäischen Norm (EN) 14476 (CEN 2015a) zur Anwendung. Das darin beschriebene Verfahren ist international anerkannt und gilt als Goldstandard in der Testung von DM. Als Parameter des virusreduzierenden Effekts wurde der Reduktionsfaktor (RF) gegenüber Modellviren bestimmt. Dies waren im Einzelnen Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA), Humanes Adenovirus Typ 5 (HAdV-5), Poliovirus Typ 1 (PV-1) und Murines Norovirus (MNV), wobei für Einwirkzeiten (EWZ) von 5, 15, 30 und 60 min jeweils ohne Eiweißbelastung gemessen wurde. Zusätzlich wurden Tests von exemplarischem

Charakter zum Nachweis eines konzentrationsabhängigen Effekts und zum Nachweis einer Reduktion viraler Nukleinsäuren verwendet. Für letzteres bedurfte es einer *quantitative Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction* (q-RT-PCR), um virale Desoxyribonukleinsäuren (DNA) bzw. Ribonukleinsäuren (RNA) quantitativ bestimmen zu können.

Während die SiNWs im quantitativen Suspensionsversuch wirkungslos waren, konnte für die SiNPs eine geringfügige Inaktivierung von MVA festgestellt werden. Diese betrug zwischen $0,71 \pm 0,60$ und $0,96 \pm 0,57 \log_{10}$ *Tissue Culture Infective Dose* (TCID)₅₀/ml. Für WC konnten demgegenüber stärkere Effekte nachgewiesen werden, wobei eine EWZ von wenigstens 15 min erforderlich war, um Wirksamkeit i.S.e. Virusreduktion um $4 \log_{10}$ TCID₅₀/ml zu erreichen. Die WC-Proben erzielten dabei RF in Höhe von $5,07 \pm 0,47$ (WC1), $\geq 5,32$ (WC2), $3,63 \pm 0,47$ (WC3), $5,08 \pm 0,43$ (WC4) und $2,31 \pm 0,56 \log_{10}$ TCID₅₀/ml (WC5) gegenüber MVA. Ähnlich hohe Werte wurden bei WC1, WC2 und WC4 gegenüber anderen den Modellviren beobachtet, während sie bei WC5 ähnlich niedrig waren. WC3 zeigte nach 15 min gegenüber HAdV-5 und MNV in Form einer Virusinaktivierung um $5,53 \pm 0,46$ bzw. $5,62 \pm 0,49 \log_{10}$ TCID₅₀/ml eine im Vergleich mit MVA sogar höhere Wirksamkeit, während gegen PV-1 lediglich eine Reduktion um $1,54 \pm 0,52 \log_{10}$ TCID₅₀/ml gemessen wurde. Ein zeitabhängiger Anstieg des RF konnte, im Gegensatz zu den Proben der SiNPs und SiNWs, bei allen WC-Proben festgestellt werden. Ebenso wurde exemplarisch für WC4 ein konzentrationsabhängiger Anstieg des RF nachgewiesen. Ergänzend konnte mittels q-RT-PCR gezeigt werden, dass die Titerreduktion durch WC1 mit einer ähnlich hohen Reduktion der Kopienzahl des viralen Genoms von PV-1 assoziiert ist. Die viralen Nukleinsäuren wurden dabei nach 15 min um $4,40 \pm 0,07 \log_{10}$ Kopien/ml reduziert.

Die erhobenen Daten belegen eine starke und breite Wirksamkeit von WC-Nanopartikeln, die damit den Wirksamkeitsanforderungen an DM gerecht werden. Dies gilt insbesondere für die Proben WC1, WC2 und WC4, während WC3 bezüglich seines Wirkspektrums eingeeengt ist. WC5 verfehlte bei vorhandener Fähigkeit zur Virusinaktivierung die Wirksamkeitsgrenze. Demgegenüber zeigten SiNPs und SiNWs keinerlei Wirksamkeit. WC-Nanopartikel besitzen dagegen optimale Eigenschaften, um sie in einer Anwendung einzusetzen. Bevor es dazu kommt, werden allerdings weitere Untersuchungen erforderlich sein, welche Fragestellungen zum Wirkmechanismus sowie zum Verhalten bei zusätzlicher Eiweißbelastung und zur Praxistauglichkeit umfassen. Da insbesondere eine Verwendung in Filtersystemen vorstellbar wäre, kann auch die Entwicklung entsprechender Filter vorangetrieben werden.

2 Einleitung

2.1 Viruzidietestung von Desinfektionsmitteln

2.1.1 Bedeutung und Entwicklung auf nationaler und internationaler Ebene

DM mit nachgewiesener Wirksamkeit gegen Viren sind notwendig, um die Ausbreitung von viralen Infektionen effizient zu verhindern. Die Viruzidietestung stellt deswegen ein wichtiges Prüfungsverfahren bei der Zulassung von DM dar. Vor diesem Hintergrund sind Leitlinien zu solchen Testverfahren auf der Basis eines breiten wissenschaftlichen Konsenses entwickelt worden, um die Testabläufe zu standardisieren.

In Deutschland übernimmt diese Aufgabe die DVV in Zusammenarbeit mit dem RKI, die zu diesem Zweck den Fachausschuss „Virusdesinfektion“ gegründet haben. Dieser setzt sich regelmäßig mit dem Inhalt solcher Leitlinien auseinander und berät über Verbesserungen und Ergänzungen. Aktuelle Verbesserungen auf dem Gebiet der Viruzidietestung betreffen u. a. die Praxistauglichkeit der Testverfahren sowie eine stärkere Standardisierung der einzusetzenden Modellviren. Letztere konnte durch den Aufbau einer dezentralen Stammsammlung, welche in Deutschland seit 2003 existiert, realisiert werden. Hierauf sollen alle anerkannten Prüflabore zugreifen, um möglichst einheitliche Testvoraussetzungen zu gewährleisten (DVV 2015). Zur Verbesserung der Praxistauglichkeit wurden zuletzt neue Leitlinien für sogenannte praxisnahe Tests formuliert, die auch den Anwendungsbedingungen im klinischen Alltag gerecht werden sollen. Dabei müssen Tests speziell für jeden Anwendungsbereich der DM, wie z.B. Händedesinfektion, Flächendesinfektion und Instrumentendesinfektion, entwickelt werden. Es zeichnet sich ab, dass die Entwicklung einen ähnlichen Weg wie in der bakteriziden Testung beschreitet, wo schon zwei Dekaden früher damit begonnen wurde, praxisnahe Tests einzuführen (Reybrouck 1992, van Klingerden 1995). Wofür auf nationaler Ebene die DVV und das RKI zuständig sind, agiert auf europäischer Ebene das *European Committee for Standardisation* (CEN) mit seinen zahlreichen Subgruppen, zu denen auch das *Technical Committee* 216 zählt. Dieses hat in den letzten Jahren viele solcher praxisnahen Tests zur bakteriziden Testung normiert und veröffentlicht. So wurden auf diesem Gebiet z.B. die Europäische Norm (EN) 1500 – Zur Prüfung von DM zur hygienischen Händedesinfektion (CEN 2013), die EN 16615 – Zur Prüfung von DM zur Oberflächendesinfektion (CEN 2015b) sowie die EN 14561 – Zur Prüfung von DM zur Instrumentendesinfektion (CEN 2006) etabliert. Die Reihe praxisnaher Tests zur Prüfung des Vorliegens von Bakterizidie ließe sich hier noch fortführen, während ähnliche Tests im Fall der Viruzidietestung größtenteils noch im Aufbau sind. Der Nachholbedarf ist

dementsprechend groß und zeigt wie die Virusforschung zugunsten der Bakterienforschung vernachlässigt wurde. Demgegenüber scheint im veterinärmedizinischen Bereich, wo Viruserkrankungen als häufige Gefahr für Nutztierbestände auftreten, eben diese Entwicklung schon gelungen zu sein. Die Anwendung von Keimträgern zur Prüfung von DM zur Oberflächendesinfektion gehört dort seit vielen Jahren zu den Standardtestmethoden und konnte in der langen Anwendungszeit optimiert werden (Yilmaz und Kaleta 2003). Als zentrale nationale Institution auf diesem Gebiet gilt die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG), die, ähnlich der DVV, Prüfleitlinien sowie Listen wirksam getesteter DM herausgibt (DVG 2016). Trotz der Entwicklung und Etablierung praxisnaher Tests, wird die In-vitro-Testung von DM ihren Stellenwert beibehalten und weiterhin ein wichtiges Werkzeug bleiben. Der quantitative Suspensionsversuch ist auf nationaler Ebene in der „Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruserkrankungen e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin“ (Rabenau et al. 2015) beschrieben und besitzt auf europäischer Ebene zusätzlich die europäische Norm EN 14476 (CEN 2015a) als Grundlage. Er hat sich als geeigneter Basistest bewährt und war deswegen auch in der hier vorgelegten Arbeit das Mittel der Wahl. Aus den Ergebnissen quantitativer Suspensionsversuche ergeben sich erste Hinweise zur viruziden Wirksamkeit potenzieller DM. Insgesamt werden alle Testverfahren der Viruzidietestung weiterhin bedeutsam bleiben, da sie die einzige Möglichkeit darstellen, die Wirksamkeit von neuen DM vor ihrem Einsatz zu überprüfen.

2.1.2 Der quantitative Suspensionsversuch

Das Hauptwerkzeug der In-vitro-Testung ist der quantitative Suspensionsversuch. In der Hierarchie der europäischen Testnormen wird er als sogenannter Phase 2/ Stufe 1-Test eingeordnet (CEN 2015a) und steht vor den praxisnahen Tests der Phase 2/ Stufe 2. Er stellt ein relativ simples Testverfahren dar, bei dem DM und Modellvirus in einem Reaktionsgefäß miteinander vermischt und anschließend für vorher festgelegte EWZ inkubiert werden. Die Inkubation findet bei Raumtemperatur und unter kontinuierlicher Durchmischung der Probe statt. Zu den vorgegebenen EWZ wird der Virustiter, als Parameter der Virusmenge, bestimmt. Zusätzlich wird der Ausgangsvirustiter (AVT) in einem separaten Kontrollansatz gemessen. Die Differenz ergibt den RF, welcher die Wirkung des DM quantifiziert (siehe Formel 2). Dabei gilt ein DM als wirksam, wenn der RF mindestens $4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ beträgt. Der Begriff „Wirksamkeit“ muss dabei gegenüber dem Begriff „Wirkung“ abgegrenzt werden. „Wirkung“ bedeutet eine nachgewiesene Virusreduktion um mehr als $0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, jedoch kleiner als die zur „Wirksamkeit“ erforderlichen $4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$.

Ein Nachteil des quantitativen Suspensionsversuchs liegt in der mangelnden Vergleichbarkeit mit der Desinfektionspraxis, da ein relativ kleines Virusvolumen mit einem relativ großen DM-Volumen vermischt wird (Rabenau et al. 2015, Morace et al. 2009). Außerdem sorgt die permanente Durchmischung für eine hohe Kontakthäufigkeit von Viruspartikeln mit DM, was den Desinfektionsprozess ebenfalls stark begünstigt. Dementsprechend müssen Ergebnisse aus Suspensionsversuchen immer mit Vorsicht beurteilt werden und sollten im Fall von „positiven“ Ergebnissen, d.h. im Sinne von nachgewiesener Wirksamkeit, durch praxisnahe Tests überprüft werden.

2.2 Bedeutung viraler Erkrankungen – Weltweit und in Deutschland

Infektionskrankheiten und darunter auch durch Viren hervorgerufene Erkrankungen können nach wie vor eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit darstellen. Ein Blick in die Berichterstattung der Medien ist oftmals ausreichend, um sich dies zu vergegenwärtigen.

Mit dem Ausbruch des Ebolafiebers im Jahr 2014 begann in Westafrika eine Epidemie ungeahnten Ausmaßes und entwickelte sich zu einer humanitären Katastrophe. Nach fast zwei Jahren und v.a. durch internationale Anstrengungen unter der Führung der *World Health Organization* (WHO) gelang es, die Epidemie zu beenden. Das Beispiel zeigt sehr deutlich, welches Ausmaß Viruskrankheiten annehmen können, wenn kaum oder wenige Maßnahmen zur Infektionsprävention verfügbar sind. Während ein solches Szenario in Deutschland kaum vorstellbar ist, kam es in Sierra Leone, Liberia und Guinea zur bisher größten und längsten Ebola-Epidemie. Die Zahlen der WHO verdeutlichen dies: Bei einer Fallzahl von etwa 28.600 Erkrankungen kam es zu rund 11.300 Todesfällen (WHO 2016). Gleichzeitig gehören diese Länder, gemessen an ihrem Bruttoinlandsprodukt je Einwohner, zu den ärmsten der Welt (Statistisches Bundesamt 2014). Ein Mangel an qualifiziertem Personal, fehlende medizinische Ressourcen z.B. in Form wirksamer DM und niedrige Hygienestandards tragen massiv dazu bei, dass sich eine Infektionskrankheit derart ausbreiten kann (Shears 2007). Krankenhäuser dienen dann weniger der Genesung, als vielmehr der Verbreitung des Virus und fungieren als wesentlicher Ansteckungsort im Rahmen nosokomialer Infektionen (Shears und O'Dempsey 2015). Desinfektion als Teil der Infektionsprävention muss gezielt, sorgfältig und v.a. mit wirksamen DM durchgeführt werden. Sind dafür die Voraussetzungen gegeben, können sie schnell und effektiv dazu beitragen, eine weitere Ausbreitung zu verhindern.

Ein anderes Beispiel sind sporadisch auftretende Fälle von schweren Atemwegserkrankungen, verursacht durch das *Middle East Respiratory Syndrome* (MERS)-Coronavirus. Immer wieder kann das plötzliche Neuauftreten solcher zuvor noch unbekannten Viruskrankheiten beobachtet werden. Eine häufige Ursache sind Viren, deren Vorkommen bisher auf bestimmte

tierische Reservoirs beschränkt war. Zu einer Übertragung auf den Menschen kann es bei einem plötzlichen und nicht vorhergesehenen Kontakt oder durch Mutation vorher streng tierpathogener Viren kommen. Ähnliche Vorgänge haben sich wahrscheinlich auch im Fall des MERS-Coronavirus zugetragen, bevor dies 2012 erstmals auftauchte (Coleman und Frieman 2014). Im ungünstigsten Fall haben diese Erreger eine für den Menschen hohe Virulenz und verursachen schwere Erkrankungen. Coronaviren, welche als harmlose Erreger milder Atemwegsinfekte bekannt sind, traten bereits zweimal in hochvirulenten Varianten auf. 2002 verursachte eine solche Variante das *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS), das dank wissenschaftlicher Anstrengungen schnell mit Coronaviren in Verbindung gebracht werden konnte (Peiris et al. 2003). Etwa eine Dekade später trat dann das MERS-Coronavirus an dessen Stelle, welches im Gegensatz zum SARS-Coronavirus weiterhin auftritt (Sutton und Subbarao 2015).

In Deutschland stehen dagegen v.a. die jährlich und saisonal auftretenden Grippewellen, verursacht durch das Influenzavirus, im Vordergrund. Dabei unterliegt das Ausmaß starken Schwankungen, die v.a. durch die hohe genetische Variabilität des Virus bedingt sind. Durch Mutationen der beiden Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase (Antigendrift) kann sich das Virus der Wirtsantwort entziehen (Both et al. 1983). Die im Vorjahr gebildete Immunität einer Wirtspopulation ist bei starken mutationsbedingten Veränderungen oftmals nicht mehr ausreichend, sodass sich saisonale Epidemien größeren Umfangs entwickeln. Zuletzt sorgte die Pandemie im Jahr 2009, welche durch eine neue Variante des Influenza-A-Subtyps H1N1 hervorgerufen wurde und auch als „Schweinegrippe“ bekannt ist, für größere Aufregung. Das Virus war durch Cozirkulation porziner Influenzaviren und dem damit einhergehenden Austausch von Gensegmenten (Antigen shift) entstanden. Die phylogenetische Analyse wies auf eine Beteiligung einer nordamerikanischen und einer eurasischen Linie porziner Influenzaviren, beide vom Subtyp H1N1, hin (Smith et al. 2009). In Deutschland erreichte die Pandemie im November 2009 ihren Höhepunkt. Insbesondere zu deren Beginn wurde von hohen Fallzahlen, hohen Hospitalisierungsraten und einer hohen Letalität berichtet, was zunächst zu großer Unsicherheit führte. Im Verlauf und durch die Analyse weiterer Meldedaten relativierten sich diese Berichte jedoch schnell (Buda et al. 2010).

Weitere Viruserkrankungen mit großem Einfluss sind virale Gastroenteritiden, welche durch Noro- oder Rotaviren hervorgerufen werden. Infektionen mit Noroviren konnten als die führende Ursache epidemisch auftretender akuter Gastroenteritiden identifiziert werden und dies weltweit und in allen Altersgruppen (Glass et al. 2009, Greig und Lee 2012, Barclay et al. 2014). Nach Angaben des RKI war die Norovirus-Gastroenteritis mit rund 75.000

laborbestätigten Fällen auch im Jahr 2014 wieder die am häufigsten übermittelte und meldepflichtige Infektionskrankheit in Deutschland (Robert Koch-Institut 2015). Noroviren haben, bedingt durch eine niedrige Infektionsdosis, hohe Konzentrationen im Stuhl von Erkrankten und durch eine hohe Umweltstabilität, ein enormes Verbreitungspotenzial (Barclay et al. 2014). Diese Eigenschaften begünstigen das Auftreten in Form von Ausbrüchen, die v.a. Gemeinschaftseinrichtungen wie Krankenhäuser, Altenpflegeheime, Kindergärten und Schulen betreffen. 2014 wurden in Deutschland 3.625 Ausbrüche an das RKI gemeldet. Von denen mit verfügbaren Ortsangaben entfiel der größte Anteil mit 36 % auf Krankenhäuser, wo v.a. ältere Menschen betroffen waren. Die höchsten altersspezifischen Inzidenzen wies jedoch die Gruppe der Kinder unter 5 Jahren auf, sodass auch das Auftreten in Kinderbetreuungseinrichtungen nicht unterschätzt werden darf (Robert Koch-Institut 2015). In einer weiteren Studie aus England wurden im Krankenhaus auftretende Ausbrüche akuter Gastroenteritiden untersucht. Von insgesamt 227 dokumentierten Ausbrüchen konnten 63 % auf Norovirus zurückgeführt werden (Lopman et al. 2004). Der Norovirus-Erkrankung kommt demzufolge eine immense Bedeutung als nosokomiale Infektion zu. Im Krankenhaus können solche Ausbrüche beachtliche Zusatzkosten verursachen wie das Beispiel einer Klinik in Österreich zeigt. Hier wurde von einem Norovirus-Ausbruch mit insgesamt 90 Fällen berichtet, bei dem Zusatzkosten in Höhe von rund 80.000 € entstanden (Fretz et al. 2009). Desinfektionsmaßnahmen können, sofern richtig und mit wirksamen DM durchgeführt, sehr effizient hinsichtlich der Unterbrechung von Infektionsketten sein (Barker et al. 2004). Gleichzeitig sind diese Maßnahmen günstig und mit relativ geringem Aufwand verbunden, sodass sie dazu beitragen, Kosten einzusparen (Lee et al. 2011).

Die hier aufgeführten Beispiele spiegeln nur einen kleinen Ausschnitt der Viruskrankheiten einschließlich ihrer gesundheitlichen, gesellschaftlichen und ökonomischen Folgen wider. Dennoch machen sie deutlich, wie aktuell und bedeutsam Viruskrankheiten sind. Angesichts dieser anhaltenden gesundheitlichen Bedrohungen ist die Notwendigkeit viruswirksamer DM unbestritten und verlangt nach neuen Ideen und Innovationen auf diesem Gebiet.

2.3 Übertragungswege von Viren und Interventionsmöglichkeiten

Hinsichtlich der Übertragung von Viren existieren mehrere Möglichkeiten. Neben den direkten Wegen der fäkal-oralen, der aerogenen und der genitalen Übertragung, gibt es auch indirekte Möglichkeiten. Hierbei spielen der Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln und Trinkwasser, die Inhalation kontaminierter Aerosole sowie die Übertragung durch die Umwelt eine wichtige Rolle (Kayser und Böttger 2010). Insbesondere im feuchten Milieu können Viren in der Umwelt über lange Zeiträume persistieren, sodass hier v.a. Flächen mit starker

Benutzung und hoher Kontakthäufigkeit eine mögliche Infektionsquelle darstellen (Ansari et al. 1988, Barker et al. 2004). Obwohl die direkten Übertragungswege im Vordergrund stehen und der Umwelt lange Zeit eine geringe Bedeutung beigemessen wurde, wird heute im Rahmen der Aufklärung nosokomialer Infektionen zunehmend erkannt, dass dies nicht unterschätzt werden sollte (Hota 2004, Weber et al. 2013).

2.3.1 Intervention durch neue Methoden der Flächendesinfektion

Aktuelle Bestrebungen gehen daher dahin, häufig von Kontamination betroffene Oberflächen nicht nur zu desinfizieren, sondern diese bereits bei der Herstellung mit einer viruziden Beschichtung auszustatten. Die Anwendung von Nanotechnologie bei der Entwicklung solcher Beschichtungen kann dabei von großem Nutzen sein. Tatsächlich gibt es allerdings noch keine Studien, die eine Reduktion nosokomialer Infektionen durch die Einführung solcher Oberflächen belegen. Auch eine Resistenzentwicklung von Viren kann nicht sicher ausgeschlossen werden (Weber und Rutala 2013), obwohl es dafür bisher keine Hinweise gibt. Aus diesen Gründen erscheint eine Etablierung im klinischen Alltag noch weit entfernt.

2.3.2 Intervention durch etablierte Desinfektionsmittel

DM werden aufgrund ihres Wirkspektrums in zwei Gruppen eingeteilt, für die die Begriffe „begrenzt viruzid“ und „viruzid“ geprägt wurden. Als „begrenzt viruzid“ gelten Verbindungen, die nur gegen behüllte Viren Wirksamkeit zeigen. Demgegenüber zeichnen sich „viruzide“ DM durch eine zusätzliche Wirksamkeit gegen unbehüllte Viren aus (Mielke et al. 2004). Diese Unterscheidung ist primär praxisrelevant, kann jedoch nicht die z.T. großen Differenzen bezüglich Resistenz und Sensitivität innerhalb der beiden Gruppen und selbst innerhalb einer Virusfamilie, wie z.B. der der Adenoviridae, widerspiegeln (Sauerbrei et al. 2004b). Neben dem Vorhandensein einer Hülle ist der Grad der Lipophilie bzw. Hydrophilie ein wichtiges Kriterium, welches die Reaktivität des Virus mit dem DM vorhersagt (siehe Tab. 1, S. 9). Für die Wirkung vieler DM ist die Interaktion mit lipophilen Komponenten der Virusoberfläche eine entscheidende Voraussetzung. Demnach nimmt die Resistenz bei geringer Lipophilie bzw. hoher Hydrophilie zu. Behüllte Viren sind schon aufgrund ihrer Hülle lipophil und DM können relativ einfach in diese Hüllmembran interkalieren. Dies führt ab einer bestimmten Konzentration schließlich zu deren Destabilisierung und Zerstörung. Hierauf beruht z.B. die Wirkung quartärer Ammoniumverbindungen. Bei unbehüllten Viren steht dagegen die Veränderung der Kapsidproteine durch Denaturierung, Alkylierung, kovalente Vernetzung und Oxidation im Vordergrund. Im Rahmen dieser Veränderungen kann die Virusstruktur entweder gänzlich

zerfallen oder es werden Proteine, welche der Adsorption an die Wirtszelle dienen, so beschädigt, dass das Virus dadurch seine Infektiosität verliert (Rabenau und Schwebke 2010). Weit verbreitete DM, die auf diese Weise ihre Wirkung entfalten, sind Verbindungen aus der Gruppe der Alkohole und Phenole, Aldehyde, Iod-Verbindungen und Aktivsauerstoff freisetzende Verbindungen wie Wasserstoffperoxid und Peressigsäure. Letztere ist sogar imstande, über das Kapsid hinaus die virale Nukleinsäure zu zerstören (Jursch et al. 2002). Während für die meisten DM Theorien zur Wirkungsweise weitgehend akzeptiert sind, existieren für Feststoffpartikel mit virusreduzierender Wirkung nur vage Vermutungen. Ein wesentlicher Unterschied bei Feststoffpartikeln ist die im Gegensatz zu den genannten Verbindungen stehende Wasserunlöslichkeit, welche einen Wirkmechanismus auf molekularer Ebene unwahrscheinlich macht. Die Art und das Prinzip der Einwirkung von Feststoffpartikeln auf Viren bedürfen daher weiterer Untersuchungen.

Tab. 1: Einteilung der Viren nach Lipophilie bzw. Hydrophilie. Als Modellviren verwendete Viren sind hervorgehoben. Verändert nach (von Rheinbaben und Wolff 2002)

Behüllte Viren		Unbehüllte Viren	
Grad der Lipophilie		Grad der Hydrophilie	
hoch	gering	gering	hoch
enthalten hohen Lipidanteil	enthalten geringen Lipidanteil	enthalten keine Lipide	enthalten keine Lipide
gute Reaktivität mit Lipiden	begrenzte Reaktivität mit Lipiden	reagieren aber mit Lipiden	keine Reaktivität mit Lipiden
z.B. HCV, Herpesviren, Retroviren	z.B. HBV, <u>Pockenviren</u>	z.B. <u>Adenoviren</u> , <u>Noroviren</u> , Rotaviren	z.B. <u>Polioviren</u> u.a. Picornaviren

2.4 Modellviren

2.4.1 Auswahl verwendeter Modellviren

Modellviren sind Viren, welche zu repräsentativen Zwecken in der Viruzidietestung eingesetzt werden. Bei ihrer Auswahl müssen viele Kriterien berücksichtigt werden, jedoch sollen sie in erster Linie ein möglichst großes Spektrum humanpathogener Viren abbilden. Es werden Vertreter verschiedener Gruppen und mit unterschiedlichen biochemisch-physikalischen Eigenschaften einbezogen, die sich zudem durch Praktikabilität und Sicherheit auszeichnen sollen. Nicht zuletzt werden Modellviren aufgrund ihrer klinischen Relevanz ausgewählt (Schwebke und Rabenau 2012). Für viele klinisch relevante Viren ist es allerdings

unpraktisch, unsicher oder einfach nicht möglich, diese für Testzwecke einzusetzen. Daher werden sogenannte Surrogatviren verwendet (Steinmann 2004), deren Vergleichbarkeit mit dem Original vorher überprüft werden muss (Sauerbrei et al. 2006, Eschrich 2010, Rabenau et al. 2010, Hartnack et al. 2008).

Zur Untersuchung der viruziden Eigenschaften von Feststoffpartikeln in der vorliegenden Arbeit erfolgte die Auswahl der Modellviren in Orientierung an der „Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin“ (Rabenau et al. 2015). Demzufolge wurden vier Modellviren in der Reihenfolge MVA, HAdV-5, PV-1 und MNV in die Testung einbezogen. Diese Reihenfolge ist sinnvoll, da die Viren geordnet nach zunehmender Chemoresistenz getestet wurden. MVA gilt als behülltes und lipophiles Virus als besonders sensitiv. Demgegenüber steht das unbehüllte und hydrophile PV-1, welche sich in der Viruzidietestung durch ein hohes Maß der Resistenz auszeichnet (Thraenhart 2002). Wenn ein DM nur geringe bzw. gar keine Wirkung gegen MVA zeigt, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es auch gegen die anderen Viren nicht wirkt.

2.4.2 Taxonomie, Aufbau und Chemoresistenz verwendeter Modellviren

2.4.2.1 Modifiziertes Vacciniavirus, Stamm Ankara (MVA)

Mit dem Ziel der Entwicklung sicherer Pockenschutzimpfstoffe konnten Mayr et al. 1975 das durch ihre Attenuierungsversuche erzeugte MVA als neue Virusvariante präsentieren. Sie hatten dazu das Ausgangsvirus Chorioallantois Vacciniavirus Ankara, einen türkischen Dermovaccinia-Stamm, insgesamt 570 Mal über Hühnerembryofibroblasten passagiert und dabei eine Veränderung des pathogenetischen Verhaltens festgestellt. Die beim Ausgangsvirus in einer Reihe von Tiermodellen nachgewiesene Virulenz schien stark gemindert zu sein (Mayr et al. 1975). Durch spätere Genomuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass das MVA im Vergleich zum Chorioallantois Vacciniavirus Ankara-Wildtyp insgesamt sechs Deletionen aufweist (Altenburger et al. 1989, Meyer et al. 1991). Es sind dabei Gene betroffen, welche für die lytische Vermehrung in Säugetierzellen essentiell sind und deren Produkte z.T. zur Immunevasion im Wirtsorganismus beitragen (Antoine et al. 1998). Eine effektive Vermehrung einschließlich der Ausbildung eines zytopathischen Effekts (zpE) kann nur noch in bestimmten Zellen, wie z.B. den BHK-21-Zellen, beobachtet werden (Carroll und Moss 1997, Drexler et al. 1998). Der Virusstamm MVA stellt somit eine stark attenuierte Variante des Vacciniavirus dar. Gemäß der Klassifikation des *International*

Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) entspricht Vacciniavirus einer Spezies und gehört zusammen mit dem früher als Erreger der Pockenerkrankung bekannten Variolavirus und acht weiteren Spezies dem Genus *Orthopoxvirus* an. Neben den Orthopockenviren existieren zwölf weitere Genera. Alle werden in der Familie der *Poxviridae* bzw. in dessen Unterfamilie der *Chordopoxvirinae*, welche Wirbeltiere infizieren, eingeordnet (ICTV 2015).

Hinsichtlich des Aufbaus handelt es sich bei Pockenviren um behüllte Viren, welche mit einer Größe von 250-300 nm die größten der hier beschriebenen Modellviren sind. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erscheint das aus Nukleinsäuren und Strukturproteinen bestehende und von einer Membran umgebene Nukleokapsid hantelförmig (siehe Abb. 1). Beidseitig davon können sogenannte Lateralkörper erkannt werden, deren Funktion unklar ist (Moss 1996).

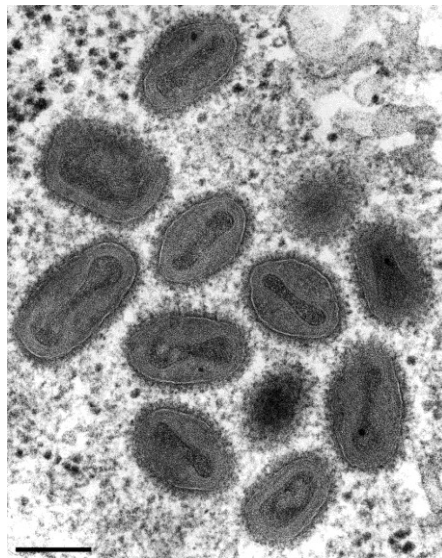


Abb. 1: Variola Major Viren, aufgenommen mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop, Maßstab = 200 nm (Gelderblom 2014)

Das Genom besteht bei Pockenviren aus einer doppelsträngigen DNA, umfasst 130 bis 360 Kilobasenpaare und beherbergt über 150 Gene, deren Produkte strukturelle, regulatorische und v.a. auch immunmodulatorische Funktionen erfüllen (Lefkowitz et al. 2006). Die Immunevasion und die dafür verantwortlichen Gene haben bei Pockenviren große Bedeutung und wurden in zahlreichen Arbeiten untersucht (Moss und Shisler 2001, Seet et al. 2003).

In der Viruzidietestung weisen Pockenviren von allen Modellviren die geringste Stabilität gegenüber chemischen DM auf. Alle gebräuchlichen DM auf der Basis unterschiedlicher Verbindungen sind im Sinne einer Virusreduktion um 4 log₁₀ TCID₅₀/ ml bereits nach 5-10 min wirksam (von Rheinbaben et al. 2007). Diese hohe Sensitivität kann mit dem Aufbau als behülltes Virus und dem damit verbundenen Lipidgehalt erklärt werden.

2.4.2.2 Humanes Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75 (HAdV-5)

Die Entdeckung der Adenoviren geht auf einen einfachen Zufall zurück. Bei der Suche nach einem geeigneten Zellkultursystem für Polioviren, konnten Rowe und seine Mitarbeiter das erste Adenovirus aus humanem Mandelgewebe isolieren (Rowe et al. 1953). Seitdem hat die Anzahl bekannter Varianten stetig zugenommen, wodurch eine Klassifikation, basierend auf den Kriterien der Sequenzhomologie und Hämagglutination, notwendig wurde. Unter den humanpathogenen Adenoviren werden sieben Spezies von A bis G (ICTV 2015) mit über 50 Serotypen unterschieden, von denen das HAdV-5 der Spezies C angehört. Weiterhin gehören die humanen Spezies zum Genus *Mastadenovirus* aus der Familie der *Adenoviridae* (van Regenmortel et al. 2000).

Der strukturelle Aufbau von Adenoviren konnte weitgehend aufgeklärt werden. Da sie geeignete Vektoren bei der Entwicklung neuer Impfstoffe und Therapien darstellen (Shiver et al. 2002, Lasaro und Ertl 2009, Rux und Burnett 2004), sind Strukturuntersuchungen auch weiterhin von großem Interesse. Adenoviren gehören zur Gruppe der unbehüllten Viren. Die Virionen bestehen aus einem Kapsid, welches mit seinen 20 Facetten und bei ikosaedrischer Symmetrie einen Durchmesser zwischen 80 und 110 nm aufweist. Es rekrutiert sich aus insgesamt 252 Kapsomeren, wobei 240 Hexone und 12 Pentone unterschieden werden. Während die 20 Facetten durch jeweils 12 Hexone zusammengesetzt werden, sind die 12 Pentone das molekulare Korrelat dessen, was morphologisch den Ecken entspricht (siehe Abb. 2, S. 13). Die Hexone ihrerseits bestehen wiederum aus einem Trimer des viralen Hexonproteins (= Polypeptid II). Demgegenüber sind die Pentone die im Vergleich größeren Polymere und bestehen aus einem Pentonbasis- und einem Fiberanteil. Die Basis entspricht einem Pentamer des viralen Polypeptids III, während die „antennenartig“ hervorragende Fiber, die jeder Pentonbasis assoziiert ist, ein Trimer des Polypeptids IV darstellt (Modrow et al. 2003). Die Fiber ist funktionell von Bedeutung, indem sie die Adsorption an den Rezeptor der Wirtszelle vermittelt (Greber et al. 1993). Es existieren darüber hinaus viele kleinere Peptide (Polypeptide IIIa, IX, X, XI, XII), die das Kapsid stabilisieren (Fabry et al. 2005).

Das Kapsid beinhaltet den Nukleoproteinkomplex, welcher aus einem 36 bis 38 Kilobasenpaare umfassenden, linear konfigurierten und doppelsträngigen DNA-Genom und genomassoziierten Proteinen (Polypeptide V, VII) besteht (Modrow et al. 2003). Das Genom codiert für etwa 40 verschiedene Regulator- und Strukturproteine und ist in neun Transkriptionseinheiten unterteilt. Aufgrund der zeitlichen Einordnung ihrer Expression im adenoviralen Replikationszyklus unterscheidet man dabei frühe E- (E = „Early“) und späte L- (L = „Late“) Einheiten (Doerr und Gerlich 2010).

Hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber chemischen DM gelten Adenoviren als moderat-sensitiv (Prince und Prince 2001). Nach nur einer Minute sind z.B. Ethanol (70 %), Glutardaldehyd (2,4 %) und Peressigsäure (0,2 %) wirksam, wohingegen Phenole und quartäre Ammoniumverbindungen keine Wirkung mehr zeigen (Rutala et al. 2006). Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass die Stabilität gegenüber DM in Abhängigkeit des jeweiligen Serotyps erheblich variieren kann (Sauerbrei et al. 2004b).

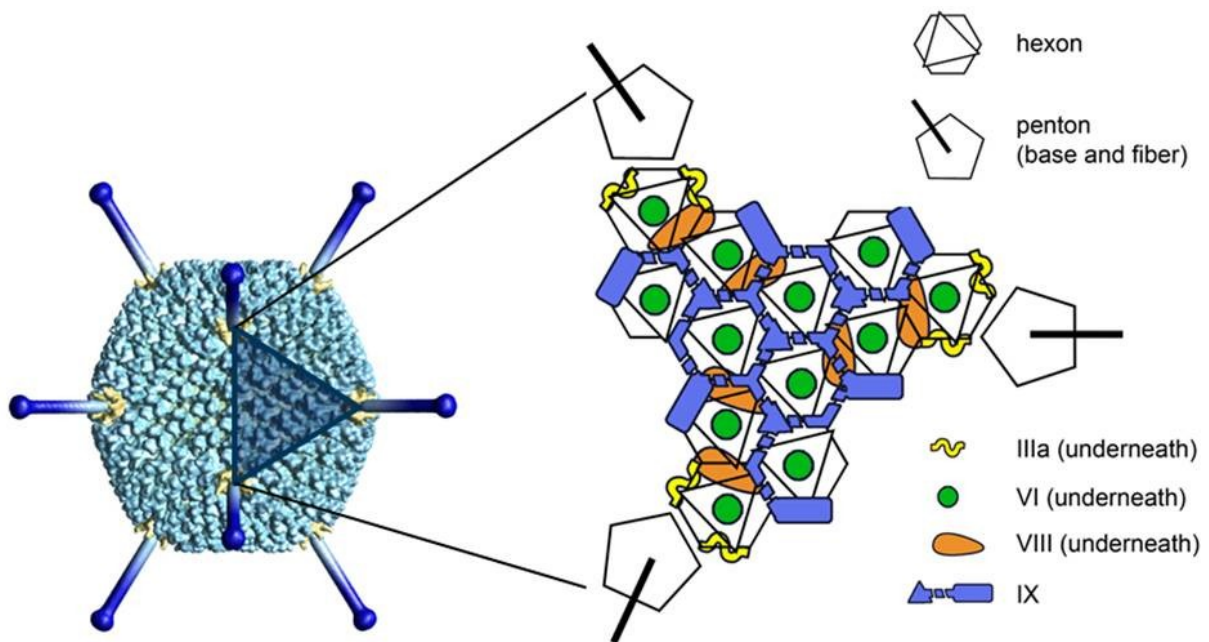


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Adenovirus-Kapsids. Der linke Bildabschnitt zeigt das Virion. Im rechten Bildabschnitt ist eine Facette des Ikosaeders hervorgehoben und einschließlich der Zusammensetzung aus den einzelnen Polypeptiden dargestellt (San Martin 2012).

2.4.2.3 Poliovirus Typ 1, Stamm LSc-2ab, Sabin (PV-1)

Taxonomisch nimmt das Poliovirus seinen Platz als Spezies Enterovirus C in der Gattung *Enterovirus* und zusammen mit 29 weiteren Gattungen in der Familie der *Picornaviridae* ein (ICTV 2015). Es sind drei verschiedene Serotypen des Poliovirus bekannt. Zur Viruzidietestung wird eine von Sabin attenuierte Variante des Serotyps 1, Stamm Mahoney, verwendet (Sabin 1985). Bis 1998 wurde der durch die Attenuierung erzeugte Stamm in Kombination mit ebenfalls abgeschwächten Varianten der Serotypen 2 und 3 in Form einer trivalenten oralen Vaccine (OPV) in Deutschland zur Immunisierung eingesetzt (Jilg 2010).

Alle Picornaviren sind in ihrer Struktur ähnlich und besitzen ein unbehülltes und ikosaedrisches Kapsid, dessen Durchmesser etwa 30 nm beträgt (Knowles et al. 2011). Die Grundlage bilden vier Strukturproteine, die der Größe nach als Virusprotein (VP) 1 bis 4 bezeichnet werden. Durch die Interaktion dieser vier Proteine miteinander kommt es zur

Ausbildung sogenannter Protomere (siehe Abb. 3A). Aus 5 Protomeren entsteht durch weitere Assemblierung das Pentamer und aus 12 Pentameren schließlich ein vollständiges Viruskapsid (Rueckert 1996). Insgesamt sind also 60 (5x12) Protomere und damit auch jeweils 60 Kopien von jedem VP zum Aufbau eines Kapsids notwendig. Weitere Untersuchungen zur Organisation der Protomere ergaben, dass VP1 bis 3 an der Kapsidoberfläche repräsentiert sind (Wetz und Habermehl 1979), während VP4 auf der Innenseite und in enger Assoziation zur viralen Nukleinsäure lokalisiert ist (Wetz und Habermehl 1982). Darüber hinaus bilden VP1-3 auf der Virusoberfläche eine Vertiefung mit dem Namen „Canyon“ (siehe Abb. 3B), die als Bindungsstelle für Rezeptoren susceptibler Wirtszellen agiert (Olson et al. 1993).

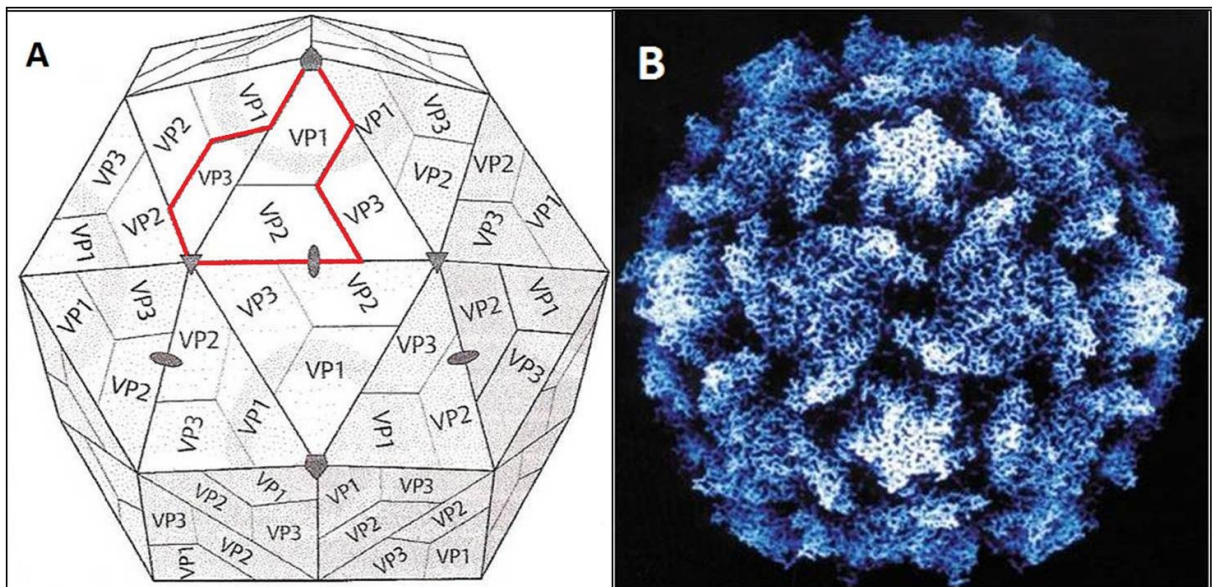


Abb. 3: Struktur der Picornaviren. (A) Schematischer Aufbau eines Picornavirus, verändert nach (Rossmann 2002). (B) Computer-Modell des Poliovirus (Hogle 2002).

Das Genom der Picornaviren besteht aus einer positiv-orientierten Einzelstrang-RNA, welche etwa 7 bis 8,8 Kilobasen umfasst. Es ist relativ einfach strukturiert und besitzt nur ein einziges Leseraster, welches für ein Polyprotein codiert. Aus diesem Polyprotein können durch proteolytische Spaltung die einzelnen Struktur- und Funktionsproteine prozessiert werden (Knowles et al. 2011).

Als Mitglied der Familie der *Picornaviridae* zählt das PV-1 zu den Viren mit der stärksten Resistenz gegenüber chemischen DM. Alkohole, wie Ethanol (70, 80 %) und Isopropanol (30, 70 %) sind z.B. ineffektiv. Dagegen sind Glutaraldehyd (0,5 %) und Peressigsäure (0,5 %) schnell wirksam. Für Formaldehyd (FA) lässt sich ebenfalls eine ausreichende Wirkung nachweisen, die jedoch erst nach über 60 min erreicht ist (Eschrich 2010, Tyler et al. 1990).

2.4.2.4 Murines Norovirus, Stamm S99 (MNV)

Norovirus stellt eine von vier Gattungen aus der Familie der *Caliciviridae* dar. Neben humanpathogenen beinhaltet die Gattung auch tierpathogene Viren. Aufgrund der hohen genetischen Diversität unter den Noroviren wurden die entdeckten Stämme auf der Basis ihrer Genomsequenz in Genogruppen eingeteilt. Hiervon sind die Genogruppen 1, 2 und 4 humanpathogen und umfassen ihrerseits jeweils mehrere Genotypen (= Stämme) (Rohayem und Rethwilm 2010). Beim Menschen werden bei Vorliegen einer symptomatischen Norovirus-Infektion am häufigsten die Vertreter der Genogruppe 2 und v.a. der Genotyp 4 nachgewiesen (Glass et al. 2009). Das für Viruzidietestungen verwendete MNV wurde 2003 erstmalig beschrieben und in einer separaten Genogruppe 5 eingeordnet. In der Maus verläuft die Infektion meist subklinisch, sofern es sich um immunkompetente Mäuse handelt (Karst et al. 2003). Da sich das MNV, im Gegensatz zu humanen Noroviren, in der Zellkultur vermehren lässt, hat es sich in der Forschung als Surrogatvirus für das humane Norovirus etabliert (Wobus et al. 2006).

Alle Caliciviren, einschließlich der Noroviren, sind unbehüllt. Ihr Kapsid ist ikosaederförmig und besitzt eine Größe zwischen 27 und 30 nm. Das VP1 stellt den Grundbaustein des Kapsids dar, wobei ein Dimer aus zwei VP1-Proteinen als Kapsomer definiert ist. Insgesamt bedarf es 90 solcher Kapsomere, die durch Assemblierung ein Kapsid entstehen lassen. Im Detail weist das VP1 zwei Domänen mit mehreren Subdomänen auf, wobei die sogenannte P2-Subdomäne an der Oberfläche exponiert wird (siehe Abb. 4, S.16). Sie ist hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz spezifisch für jeden Genotyp und ermöglicht eine Klassifikation. Neben VP1 existiert ein weiteres Strukturprotein, welches VP2 heißt und ebenfalls am Aufbau der Kapside beteiligt ist (Rohayem und Rethwilm 2010).

Das Kapsid schließt ein 7,3 bis 8,5 Kilobasen umfassendes einzelsträngiges RNA-Genom ein. Dieses ist von positiver Orientierung und kann demnach unmittelbar in ein Polypeptid translatiert werden. Das Genom ist in Form von drei offenen Leserastern organisiert, wobei eines für die Nicht-Strukturproteine NS1-NS7, welche z.B. eine virale Protease (NS6) und die RNA-abhängige RNA-Polymerase (NS7) beinhalten, codiert. In den anderen Leserastern sind dagegen die Gene für VP1 bzw. VP2 enthalten (Rohayem und Rethwilm 2010).

Norovirus wurde in Form des MNV v.a. aufgrund seiner klinischen Relevanz als Modellvirus eingeführt. Bezüglich der Resistenz kann gesagt werden, dass es sich durch die meisten gebräuchlichen DM gut und schnell inaktivieren lässt. Dazu gehören Ethanol (60 %), 1-Propanol (60 %) Isopropanol (60 %), Glutaraldehyd, Povidone-Iod, Peressigsäure und Chlor.

Nicht wirksam sind dagegen quartäre Ammoniumverbindungen (Belliot et al. 2008, Magulski et al. 2009, Paulmann et al. 2011).

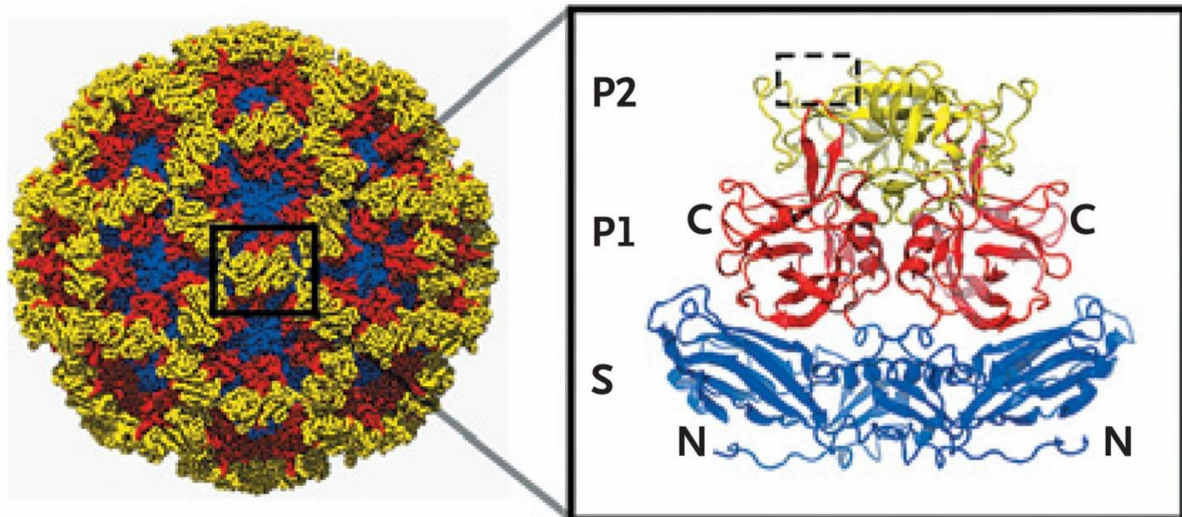


Abb. 4: Struktur des Norovirus. Der linke Bildabschnitt zeigt das Virion. Im rechten Bildabschnitt wurde das VP1 herausvergrößert und einschließlich seiner Domänen (S, P) und Subdomänen (P1, P2) detailliert dargestellt (Glass et al. 2009).

2.5 Nanopartikel

2.5.1 Definition

Nanopartikel besitzen nach einer Definition der *US Nanotechnology Initiative* eine Größe zwischen 1 und 100 nm (NNI 2016, Bourdon et al. 2012). Ihre chemische Zusammensetzung kann beliebiger Art sein, da die Größe das primäre Definitionskriterium darstellt. Zu den häufig vorkommenden Nanopartikeln gehören jedoch kohlenstoffhaltige Verbindungen, Metall- und Halbmetalloxide sowie elementare Metalle (Tourinho et al. 2012, Luo et al. 2015). Hinsichtlich des Vorkommens können außerdem natürlich auftretende von anthropogenen Nanopartikeln unterschieden werden (Smita et al. 2012, Saptarshi et al. 2013).

2.5.2 Allgemeine Eigenschaften und Reaktionsverhalten

Nanopartikel besitzen im Vergleich zu größeren Partikeln des gleichen Stoffes spezielle und einzigartige Eigenschaften (Urban et al. 2015). Dazu gehört die im Verhältnis zu ihrem Volumen große Oberfläche (Hubbs et al. 2011). Eine hohe spezifische Oberfläche zieht weitere Veränderungen in den physikalisch-chemischen Eigenschaften nach sich, sodass deutliche Abweichungen gegenüber dem größeren Rohmaterial beobachtet werden.

Das Reaktionsverhalten von Nanopartikeln ist von vielen Variablen abhängig und wird v.a. von deren Oberflächeneigenschaften entscheidend mitbestimmt. Diese sind wiederum abhängig von weiteren Eigenschaften der Nanopartikel einerseits und von Eigenschaften des Suspensionsmediums andererseits. Wichtig sind z.B. chemische Zusammensetzung, Größe und Form, Oberflächenstruktur, sowie Hydrophobie bzw. Hydrophilie der Nanopartikel und auf Seiten des Suspensionsmediums Ionenstärke, pH-Wert, Temperatur sowie die Anwesenheit organischer Moleküle (z.B. Proteine) (Nel et al. 2009). Die Kombination dieser Eigenschaften bestimmt die effektive Oberflächenladung (Zeta-Potenzial) und damit auch das Aggregationsverhalten bzw. die Verteilung der Nanopartikel in Suspension (Nel et al. 2009, Urban et al. 2015). Unter diesen Gegebenheiten können Proteine und andere in der Suspension vorhandene Moleküle adsorbiert werden, was als wichtige Grundlage aller biologischen Interaktionen gilt. Bei der Adsorption von Proteinen an die Oberfläche von Nanopartikeln wird die Ausbildung komplexer Strukturen beobachtet, welche mit dem Begriff „Protein Corona“ beschrieben werden (Saptarshi et al. 2013). In den Interaktionen sowohl mit den im Medium enthaltenen Molekülen, als auch zwischen den Nanopartikeln, werden einerseits anziehende Oberflächenkräfte (van der Waals-Wechselwirkungen) und andererseits abstoßende elektrostatische Kräfte wirksam (Nel et al. 2009). Eine hierauf basierende Tendenz zur Adsorption und Bildung von Aggregaten ist häufig. Die Partikel können sowohl untereinander als auch in Kombination mit anderen organischen Stoffen aggregieren (Skebo et al. 2007, Banerjee 2013, Loosli et al. 2015).

Ein weiterer Erklärungsansatz der biologischen Interaktion beschreibt eine intrinsische chemische Reaktivität der Partikel, welche durch die große Oberfläche zusätzlich verstärkt wird. Vor diesem Hintergrund wird vermutet, dass Nanopartikel in biologischen Systemen die Bildung von *Reactive Oxygen Species* induzieren können (Herzog et al. 2009, Smita et al. 2012). Diese Fähigkeit könnte bei der Inaktivierung von Mikroorganismen durch Oxidation eine Rolle spielen, wird jedoch auch kritisch im Zusammenhang mit dem von Nanomaterial ausgehenden Gefahrenpotenzial für Mensch und Umwelt diskutiert.

2.5.3 Risikopotenzial

Nanopartikel begegnen uns überall und täglich in unserem Leben. Dies ist beabsichtigt, wenn deren einzigartigen Eigenschaften zur Verbesserung vieler Produkte genutzt werden. So kommen sie bereits in einem breiten Spektrum industrieller Bereiche zur Anwendung (Gwinn und Vallyathan 2006). Titandioxid findet man z.B. als Inhaltsstoff von Kosmetika und Lebensmitteln, denen es als Weißpigment und in Nanogröße zugesetzt wird. In Sonnencreme dient es als UV-Blocker und bestimmt den Schutzfaktor (Mu und Sprando 2010).

Im Gegensatz zu diesen positiven Anwendungen steht die unbeabsichtigte Entstehung bei unvollständigen Verbrennungsprozessen und damit insbesondere im Straßenverkehr (Gwinn und Vallyathan 2006, Saputra et al. 2014). Hier tragen die sogenannten *Carbon Black Nanoparticles* als Bestandteil von Ruß erheblich zur Feinstaubbelastung in Städten bei (Saputra et al. 2014, Donaldson et al. 2001) und können eine Gefahr für die Gesundheit des Menschen darstellen. Aufgrund ihrer geringen Größe können Nanopartikel leicht über die Lunge aufgenommen werden und sich anschließend im gesamten Organismus verteilen, sodass auch weitere Organe einer Exposition ausgesetzt sind (Elder und Oberdorster 2006). Der Grund hierfür ist wahrscheinlich in einer sehr viel einfacheren Überwindung biologischer Barrieren zu sehen (Hubbs et al. 2011). Im Fall der im Feinstaub enthaltenen ultrafeinen Partikel des *Carbon Black* ist ein Transport bis in die kleinsten Lungenabschnitte, die Alveolen, möglich. Im Mausmodell kam es hierbei zu einer Reizung mit anschließender Entzündung (Bourdon et al. 2012, Porter et al. 2010). Diese konnte auch über das exponierte Organ hinausgehen und systemischen Charakter annehmen (Bourdon et al. 2012). In Organismen mit Vorerkrankungen wie Asthma kann die Inhalation der *Carbon Black Nanoparticles* zu einer Progression der Erkrankung führen (Ryman-Rasmussen et al. 2009, Saputra et al. 2014). Von Nanopartikeln geht demnach ein Risikopotenzial aus, das nicht unterschätzt werden darf.

2.6.4 Medizinische Anwendung

In der medizinischen Forschung hat sich in den letzten Jahren ein neuer Bereich etabliert, der sich mit möglichen biomedizinischen Anwendungen für Nanopartikel beschäftigt. Angesichts der bekannten Risiken durch Nanotechnologie, erscheint es unumgänglich, auf ein wichtiges Prinzip der Medizinethik zu verweisen. Dieses heißt „Primum non nocere“ und bedeutet, dem Patienten nicht zu schaden (Beauchamp und Childress 2009). Folglich muss ein besonders hoher Maßstab an die Sicherheit zur Diagnostik und Therapie eingesetzter Nanopartikel angelegt werden. In der Forschung steht die gründliche Untersuchung des Interaktionspotenzials solcher Nanopartikel mit humanen Zellen im Vordergrund. In experimentellen Arbeiten werden die Zytotoxizität oder die Aufnahme von Nanopartikeln durch Zellen beurteilt (Zhu et al. 2013). Die daraus hervorgehenden Ergebnisse sind unverzichtbar und bilden die Basis für Anwendungsmöglichkeiten. Nanopartikel, die von Zellen schnell und in großem Umfang aufgenommen werden, könnten als Trägerstoffe für Medikamente benutzt werden. In der Tumorthherapie könnte dies dazu beitragen, die Selektivität von Zytostatika zu verbessern und einen zielgerichteten Transport zu den Tumorzellen zu ermöglichen (Conti et al. 2006, Bharali und Mousa 2010, Dianzani et al.

2014). Durch die Kopplung an Nanopartikel wäre auch eine Modifizierung der pharmakokinetischen Eigenschaften von Medikamenten denkbar (Dianzani et al. 2014). Außer der Anwendung in Therapien könnten die Nanopartikel ebenso in vielen Verfahren der Bildgebung und Diagnostik von Nutzen sein (Sanvicens und Marco 2008).

Ein weiterer Untersuchungsgegenstand, mit dem sich auch diese Arbeit beschäftigt, ist die Frage nach dem bioziden Potenzial. In welchem Ausmaß Krankheitserreger wie Bakterien und Viren inaktiviert werden können, wird vielfach diskutiert (Koper et al. 2002, Haggstrom et al. 2010, Gaikwad et al. 2013). Ein häufig beschriebenes Wirkprinzip bei der Interaktion mit Viren, ist die Adsorption und Aggregation der Nanopartikel. Einer Hypothese zufolge würden die Viren an die Nanopartikel adsorbiert und schließlich innerhalb von Aggregaten eingeschlossen werden (Osminkina et al. 2014b). In der Vermittlung dieser Adsorption könnte auch die Interaktion mit Proteinen der Virushülle bzw. des Viruskapsids bei unbehüllten Viren wichtig sein (Saptarshi et al. 2013). Bezüglich der Dauer dieser Adsorption können kaum Vorhersagen gemacht werden, da dies im Einzelfall sehr unterschiedlich sein kann. Es ist jedoch beginnend bei einer sehr starken und irreversiblen Bindung bis hin zu einer instabilen Bindung mit vorübergehender Dauer alles vorstellbar. Neben dieser Wirkungshypothese werden auch virusstrukturenschädigende Wirkungen durch mechanisch-abrasive, sowie durch oxidative Kräfte diskutiert (Haggstrom et al. 2010). Bei einer Adsorption und Aggregation bleibt wahrscheinlich die Virusstruktur erhalten und eine noch vorhandene Infektiosität kann nicht ausgeschlossen werden. Dagegen ist eine irreversible Inaktivierung mit Verlust der Infektiosität bei einer Strukturschädigung wesentlich wahrscheinlicher. Nur in diesem Fall wäre eine Bezeichnung als DM zulässig. De facto besteht jedoch meist Unklarheit über den Wirkmechanismus und über den Zustand der Viren nach der Inkubation. Folgerichtig müssen diese Fragestellungen untersucht werden und bedürfen der weiteren und intensiveren Abklärung.

3 Ziele der Arbeit

Die Entwicklung neuartiger DM mit gänzlich anderen Wirkmechanismen als den bisher bekannten und z.T. auch anderen Anwendungspraktiken ist ein wichtiges Ziel, um pathogene Mikroorganismen auch zukünftig wirkungsvoll zu bekämpfen. Unter besonderer Beachtung von DM-Resistenzen, deren Auftreten mit zunehmender Häufigkeit v.a. bei Bakterien beobachtet wird (Grare et al. 2010, Horner et al. 2012, Prag et al. 2014), gilt es nach wirksamen Strategien zu suchen. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit Substanzen untersucht und auf das Kriterium der Viruzidie geprüft, die sich hinsichtlich ihrer Wirkungsweise von allen bisher etablierten DM grundlegend unterscheiden.

In der Entwicklung viruzider Mittel bedarf es auch der Unterstützung aus Industrie und Wirtschaft, die mit neuen Innovationen ihren Beitrag leisten können. Das Leibniz-Institut für Photonische Technologien (IPHT) in Jena und das Fraunhofer-Institut für Keramische Technologien und Systeme (IKTS) in Hermsdorf haben die Substanzen, die es zu testen galt, bereitgestellt. Dies waren vier bzw. fünf verschiedene Präparationen von Feststoffpartikeln auf der Basis von Silizium bzw. Wolframcarbid (WC), die wegen ihrer Größe von weniger als 100 nm als Nanopartikel gelten. Diese Nanopartikel hinsichtlich ihres viruziden Potenzials zu untersuchen, war das Ziel dieser Arbeit. Dabei war die Testung gegen verschiedene Modellviren durchzuführen, um das Wirkspektrum abzuschätzen. Die Wirkung musste ebenso für verschiedene EWZ und exemplarisch für verschiedene Konzentrationen des Wirkstoffs ermittelt werden. Die Zusammenschau der Ergebnisse sollte ein Wirkungsprofil ergeben, auf dessen Basis Vorhersagen zur virusinaktivierenden Wirkung getroffen werden können.

Methodisch kam zur Ermittlung der Wirkung der quantitative Suspensionsversuch entsprechend der „Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin“ (Rabenau et al. 2015) zur Anwendung.

Bei der Auswertung stand die Feststellung von Wirksamkeit bzw. Nichtwirksamkeit im Vordergrund. Weiterhin galt es, innerhalb einer Substanz signifikante Wirkungsunterschiede bei verschiedenen Modellviren zu erkennen sowie die Substanzen untereinander zu vergleichen.

Neben der Ermittlung des Wirkungsprofils wurden Versuche durchgeführt, welche zur Aufklärung des Wirkmechanismus beitragen sollten. Im Zentrum dieser Untersuchungen stand die Unterscheidung von Adsorptionsmechanismen und irreversibler Virusinaktivierung. Mit der Methode der q-RT-PCR sollten Belege oder Gegenbelege für bzw. wider eine der Hypothesen gesammelt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte, Material und Chemikalien

In den nachfolgenden Tab. 2 bis 4 finden sich alle verwendeten Geräte, Materialien sowie Chemikalien einschließlich ihrer genauen Bezeichnung und des Herstellers. Diese sind nummeriert und können dadurch im Text nachvollzogen werden, wobei an den entsprechenden Stellen ein Verweis erscheint. Der Verweis enthält neben der jeweiligen Nummer auch die zugehörige Tab. und Seitenzahl.

Tab. 2: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
(1) pH-Messgerät: 413 SevenEasy	METTLER TOLEDO (Columbus, USA)
(2) Inkubator: BBD 6220	Heraeus (Hanau, Deutschland)
(3) Zählkammer: Neubauer, 0,100 mm Tiefe/ 0,0025 mm ²	Laboroptik (Lancing, UK)
(4) Lichtmikroskop: Axiovert 25	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
(5) Zentrifuge: Biofuge Stratos	Heraeus (Hanau, Deutschland)
(6) Ultrazentrifuge: Optima XL-70, Rotortyp: Ti-45	Beckman Coulter (Brea, USA)
(7) Feinwaage: Sartorius Basic	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
(8) Schüttelgerät: Thermomixer comfort 1,5	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
(9) Schüttelgerät: Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
(10) Zentrifuge: 5415C	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
(11) Lichtmikroskop: Axioskop 2 MOT	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
(12) CCD-Kamera: AxioCam	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
(13) Personal Thermocycler	Analytik Jena (Jena, Deutschland)
(14) Photometer: Nanodrop	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)
(15) Zentrifuge: Biofuge pico	Heraeus (Hanau, Deutschland)
(16) Zentrifuge: Varifuge 3.0 R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
(17) PikoReal 96 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific (Vantaa, Finnland)

Tab. 3: Material

Bezeichnung	Hersteller
[1] Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
[2] T25-/ T75-/ T175 Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
[3] Cell culture microplate 96-Well	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
[4] Tubes 15 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
[5] Low Temperature Freeze Vials 1,2 ml	VWR (Radnor, USA)
[6] QuickSeal™, Centrifuge Tubes, 38 x 102 mm	Beckman Coulter (Brea, USA)
[7] S-400 HR Columns	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
[8] Deckgläser rund 12 mm	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
[9] innuPREP DOUBLEpure Kit	Analytik Jena (Jena, Deutschland)
[10] QIAmp® MinElute® Virus Spin Kit (50)	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
[11] SuperScript® Reverse Transcriptase	invitrogen™ (Carlsbad, USA)
[12] Piko™ PCR Plate, 96-well, Low profile	FINNZYMES (Espoo, Finnland)

Tab. 4: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
-1- Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ (6H ₂ O))	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
-2- Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ (2H ₂ O))	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
-3- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
-4- Salzsäure (HCl) 6N-Maßlösung	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
-5- Natronlauge (NaOH) 2N-Maßlösung	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
-6- Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	Lonza (Verviers, Belgien)
-7- Hepes Buffer 1 M in 0,85 % NaCl-Lsg.	Lonza (Verviers, Belgien)
-8- L-Glutamin 200 mM in 0,85 % NaCl-Lsg.	Lonza (Verviers, Belgien)
-9- Fetal Bovine Serum (FBS)	Life Technologies (Carlsbad, USA)
-10- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Lonza (Verviers, Belgien)
-11- Trypsin, Powder substance, Activity 1512 USP U/mg	Biochrom (Berlin, Deutschland)
-12- Formaldehyd (FA) 37 %	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
-13- Paraformaldehyd 4 % in PBS 7,4	Morphisto (Frankfurt, Deutschland)
-14- QuantiTect SYBR Green PCR Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland)

4.2 Lösungen und Puffer

- Lösung A

4,24 g Magnesiumchlorid (siehe **-1-**, Tab. 4, S. 22) und 6,12 g Calciumchlorid (siehe **-2-**, Tab. 4, S. 22) wurden gemeinsam abgewogen und in 100 ml Aqua bidest. gelöst. Mittels Dampfsterilisation wurde die Lösung keimfrei gemacht und war anschließend im Kühlschrank bei 5 °C einen Monat haltbar (Rabenau et al. 2015).

- Lösung B

1,4 g Natriumhydrogencarbonat (siehe **-3-**, Tab. 4, S. 22) wurden abgewogen und in 40 ml Aqua bidest. gelöst. Die Lösung wurde durch Membranfiltration (siehe **[1]**, Tab. 3, S. 22) sterilisiert und danach im Kühlschrank bei 5 °C aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen war eine Verwendung eine Woche lang möglich (Rabenau et al. 2015).

- Wasser standardisierter Härte

Zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte (WSH) wurden 60 ml Aqua bidest. in ein Becherglas gegeben. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 600 µl der Lösung A und 800 µl der Lösung B. Nach kurzer Durchmischung wurde mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt und erneut gemischt. Schließlich musste der pH-Wert der Lösung kontrolliert und mithilfe von 1-molarer Salzsäure (siehe **-4-**, Tab. 4, S. 22) bzw. 1-molarer Natronlauge (siehe **-5-**, Tab. 4, S. 22) auf den Wert $\text{pH} = 7 \pm 0,1$ eingestellt werden, wobei zur Messung eine pH-Messelektrode (siehe **(1)**, Tab. 2, S. 21) verwendet wurde. WSH wurde zu jedem Versuchstag frisch angesetzt und nur für die Dauer eines Versuchs verwendet (Rabenau et al. 2015).

4.3 Zellkultur

Entsprechend der Anzahl der in die Testung einbezogenen Modellviren, kamen ebenso viele unterschiedliche Zellarten zum Einsatz. Bei allen verwendeten Zellarten handelt es sich um permanente Zelllinien, deren Eigenschaften wie z.B. Wachstumskinetik, Vermehrung und Suszeptibilität gegenüber einem Virus, unabhängig von der Passagezahl und im Gegensatz zu primären Zellen, stabil bleiben. Ebenso ist die Lebensdauer solcher Zellen unbegrenzt, sodass sie sich sehr gut zur Durchführung virologischer Tests eignen.

4.3.1 “Baby Hamster Kidney” - BHK-21 [C13] (American Tissue Culture Collection (ATCC)[®] CCL-10TM)

Bezugspartner: *Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine*
Friedrich-Löffler-Institut
D-17493 Greifswald - Insel Riems

Die Primärzellen der späteren BHK-21-Zelllinie wurden ursprünglich aus dem Nierengewebe neugeborener (1 Tag alt) syrischer Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) isoliert (Macpherson und Stoker 1962). Nach der Etablierung der Zelllinie und der anschließenden Aufnahme in die ATCC® kam sie schließlich 1989 in der 53. Subkultur in Besitz der *Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine* des Friedrich-Löffler-Instituts. Die BHK-21-Zellen weisen spindelförmige und langgestreckte Zellkörper auf und werden den Fibroblasten zugeordnet. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden Zellkulturen verschiedener Passagen verwendet, die sich institutsintern in der 6.-8., der 16., 18.-20. und 22. sowie in der 24.-26., 34. und 36. Subkultur befanden (siehe Tab. 5, S. 25).

4.3.2 “Human Lung Carcinoma Cell Line” - A-549 (ATCC® CCL-185™)

Bezugspartner: Institut für Molekulare Virologie
 Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung
 D-48149 Münster

Für die Etablierung der humanen Lungenkarzinomzelllinie wurden aus einem explantierten Lungentumor eines 58-jährigen männlichen Patienten Zellen isoliert und anschließend kultiviert (Giard et al. 1973). Es handelt sich um Epithelzellen, welche in einem ungeordneten Muster zusammenhängende Monolayer ausbilden. In dieser Arbeit kamen in den Versuchen Zellen der 31.-34. sowie 36., 38. und 44. Passage zum Einsatz (siehe Tab. 5, S. 25).

4.3.3 “Monkey African Green Kidney” - BGM (ECACC 90092601)

Bezugspartner: MicroLab GmbH - Labor für angewandte Mikrobiologie
 D-28259 Bremen

Die BGM-Zellen entstammen dem Nierengewebe der in vielen Teilen Subsahara-Afrikas weit verbreiteten Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*). Sie wurden 1970 als Zelllinie etabliert (Barron et al. 1970) und gelten als geeignet zur Vermehrung von Enteroviren (Dahling et al. 1974). Morphologisch entsprechen die BGM-Zellen Epithelzellen. Zur Verwendung kamen in der vorliegenden Arbeit Zellen der 12.-15. sowie 18. Passage (siehe Tab. 5, S. 25).

4.3.4 „Murine Macrophage Cell Line“ - RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™)

Bezugspartner: Labor Dr. Merk und Kollegen
 D-88416 Ochsenhausen

Die Zellen entstammen einem in Mäusen (*Mus musculus*) durch das Murine Abelson-Leukämie-Virus induzierten Tumor und wurden aus dem Aszites adulter männlicher Mäuse gewonnen (Raschke et al. 1978). Bezüglich des Zelltyps handelt es sich um Monozyten bzw. Makrophagen. Sie treten überwiegend vereinzelt auf, sind jedoch auch in begrenztem Ausmaß in der Lage, Monolayer auszubilden. Im Vergleich zu Epithelzell-Monolayern weisen diese jedoch größere Lücken auf und sind auch nach mehreren Tagen nicht geschlossen. Es wurden Zellen aus den Passagen 11-14 sowie 16 und 20 verwendet (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Zelllinien mit Angabe verwendeter Passagezahlen.

Zelllinie	BHK-21	A-549	BGM	RAW 264.7
Verwendete Passagezahlen	6., 8., 9., 16., 18., 19., 20., 22., 24., 25., 26., 34., 36.	31., 32., 33., 34., 36., 38., 44.	12., 13., 14., 15., 18.	11., 12., 13., 14., 16., 20.

4.3.5 Vermehrung der Zellkulturen

- Zellpassagierung

Alle Zellen wurden in T25- bis T75-Zellkulturflaschen (siehe [2], Tab. 3, S. 22) vermehrt. Ganz im Sinne der Versuche verfolgten die Umsatzbedingungen das Ziel, die Zellen an ein möglichst langes Überleben und ohne Degenerationserscheinungen zu gewöhnen. So wurden die Zelllinien BHK-21, A-549 und BGM nur einmal wöchentlich und im Verhältnis von 1:4 umgesetzt. Am dritten Tag nach dem Umsetzen wurde außerdem das Medium ausgetauscht. Im Gegensatz dazu war bei der RAW 264.7-Zelllinie ein Umsetzen zwei- bis dreimal wöchentlich und im Verhältnis 1:2 notwendig, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten. Je nach Zelllinie kamen zur Anzucht unterschiedliche Zellkulturmedien zum Einsatz. Es wurde *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) mit *Earle's Balanced Salt Solution* (siehe -6-, Tab. 4, S. 22), ohne bzw. mit 25 mM Hepes (siehe -7-, Tab. 4, S. 22), jedoch stets mit 2 mM L-Glutamin (siehe -8-, Tab. 4, S. 22) und 10 % fetalem Rinderserum (FBS) (siehe -9-, Tab. 4, S. 22) bei BHK-21 bzw. RAW 264.7 zugegeben. A-549 und BGM wurden dagegen in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (siehe -10-, Tab. 4, S. 22) mit 4,5 g/l Glukose, 4 mM L-Glutamin und 10 % FBS gehalten. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator (siehe (2), Tab. 2, S. 21) bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Einen Überblick über alle Zelllinien einschließlich ihrer Passagebedingungen und die jeweils verwendeten Zellkulturmedien gibt Tab. 6.

Tab. 6: Zelllinien einschließlich ihrer Passage-/ Kulturbedingungen und Kulturmedien.

Zelllinie	Umsatz-Häufigkeit	Umsatz-Verhältnis	Mediumwechsel Zeitpunkt	Kulturmedium Anzucht/Wechsel	Kulturbedingungen
BHK-21	1x/ Woche	1:4	3 Tage nach Umsatz	EMEM w/o Hepes, 10 % FKS	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte
A-549	1x/ Woche	1:4	3 Tage nach Umsatz	DMEM, 10 % FKS	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte
BGM	1x/ Woche	1:4	3 Tage nach Umsatz	DMEM, 10 % FKS	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte
RAW 264.7	2-3x/ Woche	1:2	nicht durchgeführt	EMEM, 10 % FKS	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte

- Vorbereitung zur Virusinfektion

Die Zellkulturen, in denen die Bestimmung des Virustiters erfolgen sollte, wurden am Vortag der Versuche in den Kavitäten von 96-Wellplatten (siehe [3], Tab. 3, S. 22) angelegt. Für die Aussaat mussten Suspensionen hergestellt werden, welche die Zellen in einer Konzentration von $1,0$ bis $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml enthalten sollten. Nach Entfernung des Mediums wurden zu diesem Zweck die Zelllinien BHK-21, A-549 und BGM enzymatisch und mithilfe von Trypsin (siehe -11-, Tab. 4, S. 22) bzw. nur mechanisch und mithilfe eines Schabers im Fall von RAW 264.7 aus den Zellkulturflaschen abgelöst. Die Aufnahme der abgelösten Zellen erfolgte zunächst in einem geringen Volumen von 15-20 ml Anzuchtmedium. In dieser Suspension wurde die Zellzahl durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer (siehe (3), Tab. 2, S. 21) bestimmt. Darauf basierend konnte die Suspension entsprechend weiterverdünnt werden, um die gewünschte Zellzahl zwischen $1,0$ und $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml zu erreichen. Im Mittel enthielten die Suspensionen $1,23 \pm 0,28 \times 10^5$ Zellen/ml (Streuung als 95 %-Konfidenzintervall (KI) angegeben). Abschließend wurden die einzelnen Kavitäten der 96-Wellplatten mit jeweils 200 µl der hergestellten Zellsuspension bestückt. Durch Inkubation für 24 h sollten die ausgesäten Zellen bis zum nächsten Tag adhärent werden und konfluente Monolayer ausbilden.

Aus Tab. 6 konnte entnommen werden, dass die verschiedenen Zelllinien unterschiedlich behandelt wurden. Weitere Unterschiede bei den eingesetzten Kulturmedien und Kulturbedingungen existierten außerdem bei allen Zelllinien zwischen den Zeitpunkten vor

und nach der Infektion. Eine Zusammenstellung der verschiedenen Zelllinien sowie der dafür eingesetzten Kulturmedien und -bedingungen vor und nach der Infektion zeigt Tab. 7.

Tab. 7: Zelllinien einschließlich ihrer Kulturbedingungen sowie Kulturmedien vor und nach Infektion.

Zelllinie	Anzuchtmedium vor Infektion	Wechselmedium nach Infektion	Kulturbedingungen vor Infektion	Kulturbedingungen nach Infektion
BHK-21	EMEM w/o Hepes, 10 % FKS	EMEM w/o Hepes, 5 % FKS	37 °C, 1 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte
A-549	DMEM, 10 % FKS	EMEM, 2 % FKS	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte
BGM	DMEM, 10 % FKS	EMEM, 2 % FKS	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte
RAW 264.7	EMEM, 10 % FKS	EMEM, 2 % FKS	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte	37 °C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchte

4.4 Modellviren

4.4.1 Modifiziertes Vacciniavirus, Stamm Ankara

Das MVA wurde in der ersten Passage vom Institut für Medizinische Virologie des Universitätsklinikums in D-60596 Frankfurt am Main übernommen. Aufgrund der sich anschließenden Virusvermehrung wurden zur Durchführung der Versuche schließlich Virussuspensionen der 2., 4., 5. und 7. Passage verwendet (siehe Tab. 9, S. 30).

4.4.2 Humanes Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75

Das Institut für Virologie der Medizinischen Hochschule in D-30625 Hannover, welches auch als nationales Referenzlabor für Adenoviren zuständig ist, hat das HAdV-5 zur Verfügung gestellt. Zum Zeitpunkt der Übergabe befand sich das Virus in der 5. Passage, wobei in den Versuchen dieser Arbeit Virussuspensionen der 6. Passage zum Einsatz kamen (siehe Tab. 9, S. 30).

4.4.3 Poliovirus Typ 1, Stamm LSc-2ab, Sabin

Das PV-1 war zunächst im Besitz der Firma Chiron-Behring und wurde dann in der zweiten Passage über das MikroLab GmbH in D-28259 Bremen bezogen. Für die Versuche wurden Virussuspensionen der 4. Passage eingesetzt (siehe Tab. 9, S. 30).

4.4.4 Murines Norovirus, Stamm S99

Das MNV wurde über das Labor Dr. Merk und Kollegen in D-88416 Ochsenhausen bezogen, stammt jedoch ursprünglich aus der Virusbank des Friedrich-Löffler-Instituts auf der Insel Riems (D-17493 Greifswald). Das Virus befand sich bei Übergabe in der dritten Passage und wurde nach wiederholter Subkultivierung schließlich in der 12. Passage für die Versuche in dieser Arbeit verwendet (siehe Tab. 9, S. 30).

4.4.5 Virusvermehrung

In der Leitlinie (Rabenau et al. 2015) wird gefordert, dass die für Versuchszwecke eingesetzten Virussuspensionen einen hohen AVT haben sollen. Als hoch gilt demnach ein Virustiter gleich oder größer als $8 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Demzufolge mussten hochkonzentrierte Virussuspensionen hergestellt werden, die diesen Forderungen gerecht werden. Dies geschah auf zweierlei Weise und zwar sowohl durch die alleinige Virusvermehrung in der Zellkultur, als auch durch die sich anschließende Ultrazentrifugation (UZ) des gewonnenen Zellkulturüberstandes (ZKÜ). Das in der UZ sedimentierte Virus wurde nachfolgend in einem kleineren Volumen resuspendiert, wodurch eine Konzentrierung erreicht wurde. I.d.R. war eine zweimalige Passagierung im ZKÜ mit anschließender UZ ausreichend, um einen Virustiter gleich oder größer als $8 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ zu erzielen. Informationen zu den für die Vermehrung verwendeten Ausgangsvirussuspensionen können Tab. 8 entnommen werden.

Tab. 8: Zur Vermehrung verwendete Ausgangsvirussuspensionen.

Virusart	Passagezahl	Datum der Herstellung	Virustiter ¹ ($\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$)
MVA/ ZKÜ	2.	15.08.2013	$7,65 \pm 0,45$ ²
MNV/ ZKÜ	10.	20.02.2014	$7,75 \pm 0,35$

¹ Virustiter sind als Mittelwerte aller durchgeführten Titrationen zur Bestimmung des AVT angegeben bzw. wurden der institutsinternen Dokumentation entnommen

² Fehlerintervalle sind als 95 %-KI angegeben

In den Fällen von HAdV-5 sowie von PV-1 waren noch Reserven hochkonzentrierter Virussuspensionen in der Virusstammsammlung des Instituts für Virologie und Antivirale Therapie Jena vorhanden, sodass auf diese zurückgegriffen werden konnte.

Für die erste Passage des zu vermehrenden Virus wurden in zwei T25-Zellkulturflaschen Zellen ausgesät. Nach 24 h Inkubation waren die Zellen zu konfluenten Monolayern angewachsen, sodass im nächsten Schritt deren Infektion erfolgte. Dazu wurde das alte

Medium abgenommen und durch ein Infektionsmedium ersetzt. Dieses enthielt neben 1 ml Medium etwa 30-35 µl der verwendeten Ausgangsvirussuspension, entsprechend einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von ca. 0,05. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellrasen dreimalig mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS) gewaschen und es wurde erneut ein Mediumwechsel durchgeführt. Dabei wurden 5 ml EMEM mit 5 % FBS zugegeben. Die infizierten Zellkulturen wurden schließlich bis zum Erreichen des maximalen zpE bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator aufbewahrt. Das Fortschreiten des zpE wurde täglich und unter mikroskopischer Beurteilung (siehe (4), Tab. 2, S. 21) kontrolliert. Dabei wurde auch der Anteil der virusinfizierten Zellen abgeschätzt. Waren < 25 % der Zellkultur von zytopathischen Veränderungen betroffen, galt die Kultur als einfach positiv (+). Bei einem Befall von 25-49 % wurde eine Kultur als zweifach positiv (++) beschrieben und bei 50-74 % als dreifach positiv (+++). Ein die gesamte Zellkultur, d.h. ≥ 75 %, erfassender zpE, wurde als vierfach positiv (+++++) bezeichnet und führte zur Beendigung der Virusvermehrung durch Einfrieren der Zellmonolayer einschließlich ihres Überstandes bei -80 °C. Durch insgesamt dreimaliges Frieren und Tauen wurden die noch lebenden Zellen lysiert und das darin eingeschlossene Virus freigesetzt. Der gewonnene Überstand wurde schließlich in 15-ml-*Tubes* (siehe [4], Tab. 3, S. 22) überführt und zur Abtrennung des noch im Überstand vorhandenen Zelldetritus zentrifugiert (für 15 min bei 778 g und 4 °C (siehe (5), Tab. 2, S. 21)). Die erhaltene und von Zelldetritus gereinigte Virussuspension wurde anschließend zu den benötigten Portionen in Kryostase-Behälter (siehe [5], Tab. 3, S. 22) überführt und bei -80 °C zur Aufbewahrung eingefroren.

In der Folgeweche fand eine Wiederholung der gleichen Prozedur in einem sehr viel größeren Maßstab statt. Für eine UZ bedarf es großer Volumina virushaltigen Überstandes, um entsprechend viel Virus anreichern zu können. Folglich wurde die Menge der Zellkulturen, in denen das Virus replizieren kann, drastisch erhöht. Insgesamt waren Zellkulturen in sechs T175-Zellkulturflaschen nötig, welche am Folgetag ihres Anlegens infiziert wurden. Zur Infektion wurden 1,5 ml der in der Vorwoche hergestellten Virussuspension, sowie 15 ml Medium zugegeben. Unter Berücksichtigung von Zellzahl und Virustiter entsprach dies einer MOI von ca. 0,5. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellkulturen einer dreimaligen Waschung mit PBS und einem anschließenden Mediumwechsel mit Zugabe von 25 ml je T175-Zellkulturflasche unterworfen. Im weiteren Verlauf war die Behandlung im Vergleich mit den in der Vorwoche infizierten Zellkulturen identisch. 150 ml virushaltigen Überstandes wurden auf diese Weise gewonnen und der UZ zugeführt.

Zur UZ wurde der Überstand zu jeweils 75 ml in zwei Zentrifugen-Röhrchen (siehe [6], Tab. 3, S. 22) überführt. Die Röhrchen wurden mit PBS auf 100 ml aufgefüllt und verschlossen. Nach der UZ (für 2 h bei 185.511 g und 4 °C (siehe (6), Tab. 2, S. 21)) wurde das gut sichtbare Viruspellet in 2 bis 4 ml PBS resuspendiert. Die konzentrierte Virussuspension wurde in die für die Versuche benötigten Portionen geteilt, in Kryostase-Behälter überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Tab. 9 stellt die durch eigene Vermehrung erhaltenen sowie alle für Versuche verwendete Virussuspensionen dar. Durch einen direkten Vergleich von Tab. 8 und 9 kann über den Anstieg des Virustiters die Effektivität der Virusvermehrung beurteilt werden.

Tab. 9: Zu Testzwecken verwendete Virussuspensionen.

Virusart	Passagezahl	Datum der Herstellung	Virustiter³ (log₁₀TCID₅₀/ml)
MVA/ ZKÜ	2.	15.08.2013	7,65 ± 0,45 ⁴
MVA/ UZ	4.	28.11.2014	8,75 ± 0,35
MVA/ UZ	5.	16.01.2015	7,88 ± 0,37/ 6,75 ⁵ ± 0,33
MVA/ UZ	5.	13.02.2015	8,25 ± 0,45/ 6,38 ^{5±} 0,25
MVA/ UZ	7.	13.02.2015	6,88 ⁵ ± 0,47
HAdV-5/ ZKÜ	6.	08.02.2010	10,00 ± 0,47/ 9,57 ⁵ ± 0,37
PV-1/ ZKÜ	4.	10.07.2007	9,34 ± 0,49/ 8,88 ^{5±} 0,39
MNV/ UZ	12.	12.05.2015	10,11 ± 0,41/ 9,92 ^{5±} 0,42

³ Virustiter sind als Mittelwerte aller durchgeführten Titrationen zur Bestimmung des AVT angegeben

⁴ Fehlerintervalle sind als 95 %-KI angegeben

⁵ für die Versuche mit Formaldehyd (FA) wurden die Proben einschließlich der Viruskontrolle (VK) über Gelfiltrationssäulen geführt

4.5 Testsubstanzen

Die zu testenden Substanzen wurden durch das IPHT Jena und das IKTS in Hermsdorf bereitgestellt. Zusätzlich wurde FA als Referenzsubstanz gegen alle Modellviren im Rahmen der Kontrollversuche getestet.

4.5.1 Silizium-Nanostrukturen (IPHT, Jena)

Bor-dotiertes, jedoch sonst reines kristallines Silizium ist das Ausgangsmaterial, aus dem die Silizium-Nanostrukturen durch das IPHT hergestellt werden. Das Ausgangsmaterial in Form von Wafern wird durch elektrochemisches Ätzen zu sehr dünnen und porösen Silizium-Schichten weiterverarbeitet (siehe Abb. 5, S. 31).

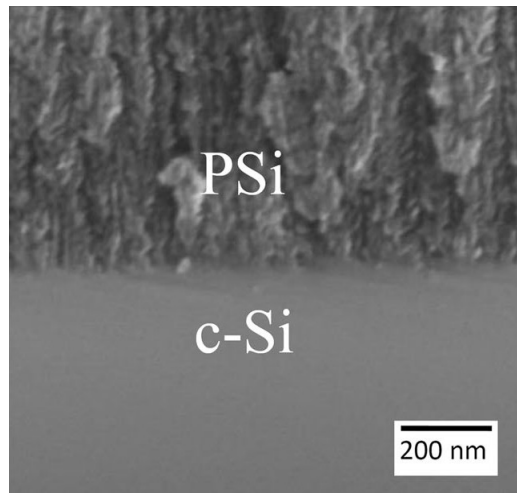


Abb. 5: Poröses Silizium (PSi) und kristallines Silizium (c-Si), aufgenommen mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) (Osminkina et al. 2014b).

Das Ätzen erfolgt bei einer Stromdichte von 60 mA/cm^2 und in Gegenwart von Flusssäure für 60 min (Osminkina et al. 2014b). Im Anschluss an den Ätzvorgang werden die porösen Silizium-Schichten, welche strukturell ein Maschenwerk aus miteinander verbundenen Nanokristallen und dazwischenliegenden Poren darstellen (Cullis et al. 1997), mechanisch zerkleinert. Dies wird mithilfe einer Kugelmühle realisiert, wobei Partikel einer Größenordnung von wenigen Nanometern entstehen (siehe Abb. 6a) (Osminkina et al. 2014b). Die Partikel selbst enthalten ebenfalls Poren. Gemäß einer Klassifikation der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) werden je nach Porendurchmesser makroporöse, mesoporöse, mikroporöse und nicht-poröse SiNPs unterschieden (Rouquerol et al. 1994).

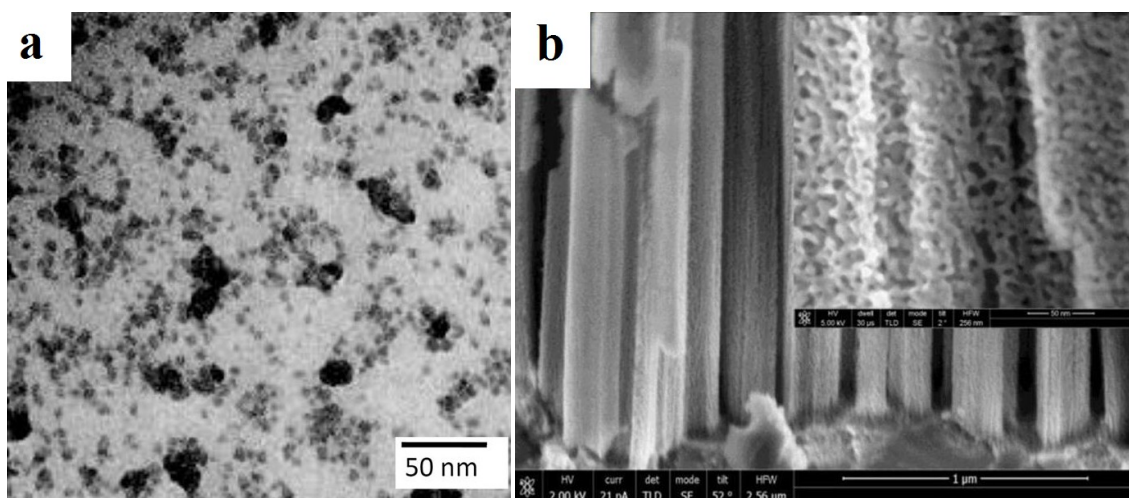


Abb. 6: SiNPs (a) und SiNWs (b), aufgenommen mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) bzw. Rasterelektronenmikroskop (REM) (Osminkina et al. 2014b, 2014a).

Neben den mesoporösen SiNPs, welche in verschiedenen Konzentrationen zu viruziden Testung eingesetzt wurden, gibt es außerdem SiNWs. Morphologisch entsprechen diese Strukturen Fasern, die mit 5 µm zwar sehr lang sein können, jedoch ebenfalls einen Durchmesser im nm-Bereich besitzen (siehe Abb. 6b, S. 31). Proben dieser Art wurden auch in die Versuche zur Viruzidie mit einbezogen. In der Herstellungsmethode der SiNWs kommt ein ähnliches Prinzip wie bei den SiNPs zur Anwendung, jedoch mit leichten Abweichungen und ohne mechanische Zerkleinerung (Osminkina et al. 2014a).

Tab. 10 zeigt eine Zusammenstellung der Silizium-Nanostrukturen, für die eine Viruzidietestung durchgeführt wurde.

Tab. 10: Zur Viruzidietestung verwendete Silizium-Nanostrukturen.

Bezeichnung	Konzentration (mg/ml)
Si1 (Mesoporöse SiNPs + PBS (1:16))	0,8
Si 2 (Mesoporöse SiNPs + PBS (1:1) autoklaviert)	4,0
Si3 (SiNWs + PBS (1:1))	0,32
Si4 (SiNWs + PBS (1:1) autoklaviert)	0,32

Alle Proben wurden als Suspensionen durch Herrn Dr. rer. nat. V. Sivakov vom IPHT in D-07745 Jena übergeben. Im Rahmen der vorliegenden Versuche erfolgte die Weiterverdünnung in PBS.

4.5.2 Wolframcarbide-Nanopartikel (IKTS, Hermsdorf)

Bei Wolframcarbiden (WC) handelt es sich um Mischkristalle aus den beiden Elementen Wolfram und Kohlenstoff. Wolfram gehört zur Gruppe der Metalle, bei denen die Atome in einer typischen Gitterstruktur mit hohem Ordnungsgrad vorliegen. Stoffe einer solchen Struktur werden daher auch als Kristalle bezeichnet. Ein Wolframatom besitzt einen Radius von 135 pm, wohingegen dieser bei Kohlenstoffatomen nur 70 pm beträgt. Das Verhältnis beider Atomradien, das Radienverhältnis, ergibt in diesem Fall 0,52. Bei etwa zweifacher Größe der Wolframatom können alle Zwischengitterlücken durch Einlagerung von Kohlenstoffatomen besetzt werden (Sauermann und Barke 1997). Es resultiert eine äußerst dichte Packung der Atome, wobei bei kompletter Lückenfüllung jedes Wolframatom von sechs Kohlenstoffatomen umgeben ist und umgekehrt (siehe Abb. 7, S. 33). Als Folge hiervon ergeben sich Änderungen der physikalischen Eigenschaften, wobei sich diese bei WC in der Härte und einem hohen Schmelzpunkt ausdrücken (Sauermann und Barke 1997).

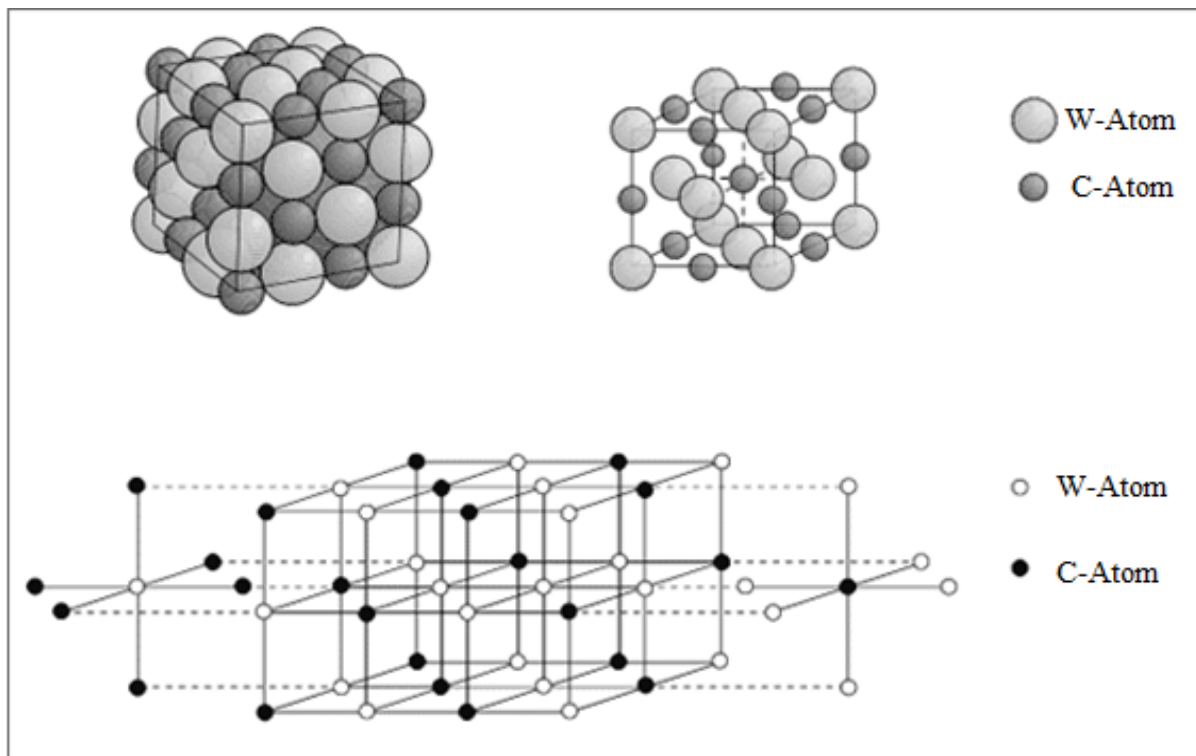


Abb. 7: Schematische Darstellung der Struktur von WC. Verändert nach (Sauermann und Barke 1997)

Um dieses robuste Material in die Form eines feinkörnigen Pulvers mit einer Partikelgröße im Bereich weniger Nanometer zu transformieren, bedarf es eines großen Energieaufwands. Durch Plasmazerstäubung, bei der in einer Vakuumkammer durch Anlegen einer Gleichspannung von mehreren 100 Volt ein Edelgas ionisiert und anschließend zum Beschuss des Substrats verwendet wird, können die Partikel in sehr kleine Fragmente „zerstäubt“ werden. Das gebildete Material enthält ultrafeine Partikel, deren Durchmesser im Größenbereich von wenigen Nanometern liegt (siehe Abb. 8, S. 34). Neben den beschriebenen Verfahren kommt für WC₃ (Aviro-OC-01/13) zusätzlich ein mechanisches Legierungsverfahren zur Anwendung. Dabei werden die Ausgangspulver aus Wolfram und Kohlenstoff gemeinsam vermahlen. Durch im Wechsel und wiederholt stattfindendes Verschweißen zu Agglomeraten und erneutem Aufbrechen entstehen Teilchen neuer Zusammensetzung. Auch bei dieser Methode bildet sich ein sehr feinkörniges Pulver. Tab. 11 (S. 35) listet die insgesamt fünf getesteten WC-Proben einschließlich wichtiger physikalischer Eigenschaften auf.

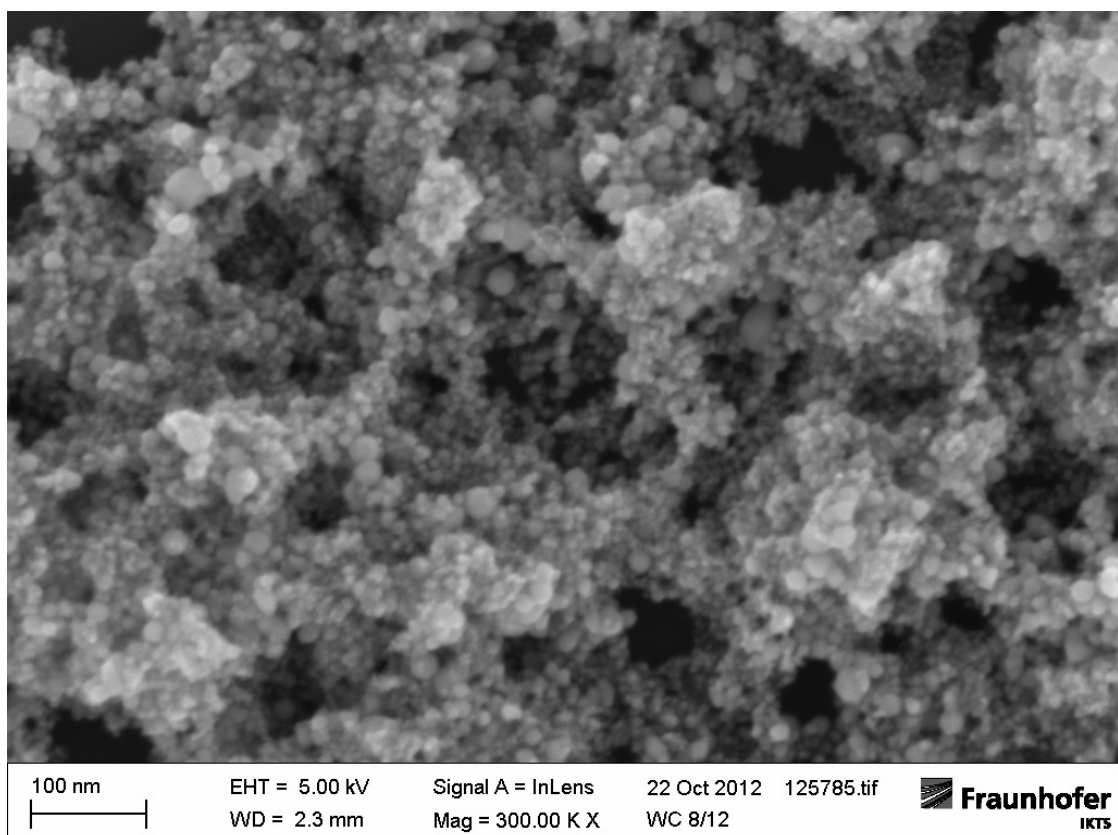
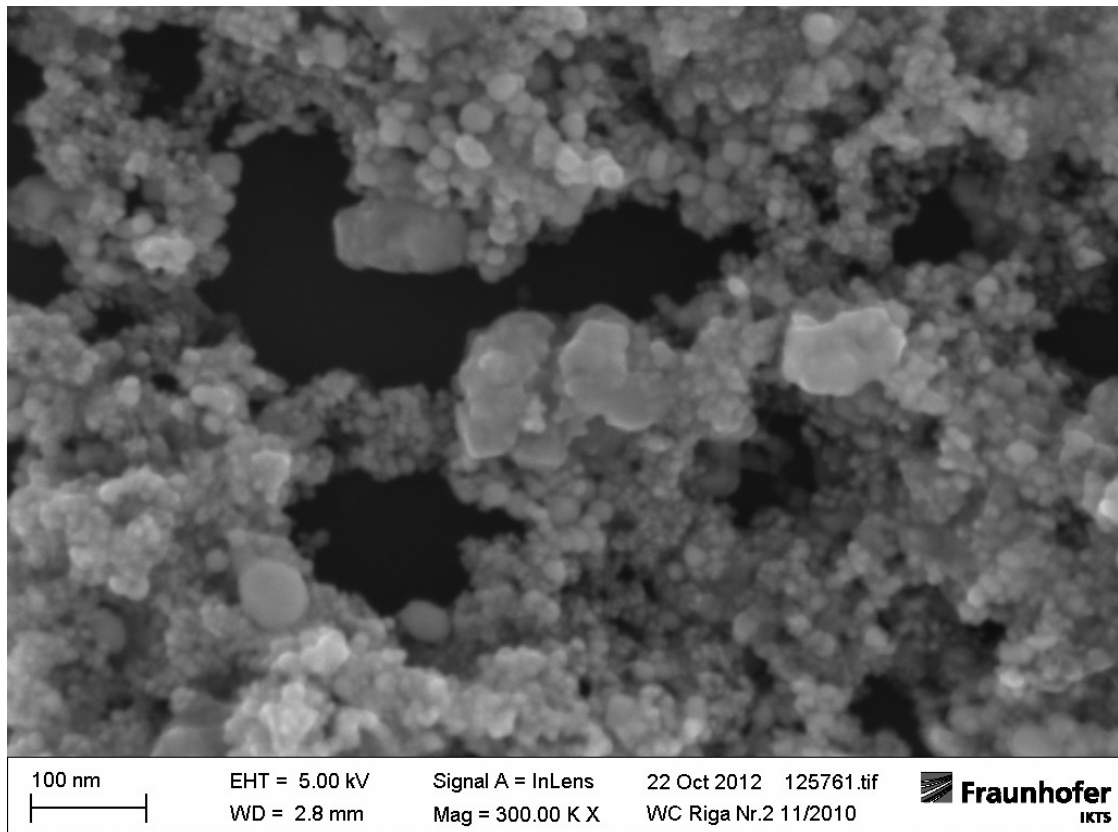


Abb. 8: WC Riga 6 (oben) und W2C/C 08/12 (unten), aufgenommen mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) bei 300.000-facher Vergrößerung. Mit freundlicher Genehmigung von Dipl.-Phys. D. Rohländer (IKTS, Hermsdorf) (Rohländer 2015, pers. Mitteilung).

Tab. 11: WC-Pulver einschließlich ausgewählter physikalischer Eigenschaften. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. T. Hoyer (IKTS, Hermsdorf) (Hoyer 2015a, pers. Mitteilung).

Bezeichnung	Verfahren	C-Überschuss (Ma-%)	Partikelgröße (nm)	BET-Oberfläche (m ² /g)
WC1 (WC 3530 Riga)	Plasmazerstäubung	6,3	10-20	45 ⁶ / 37 ⁷
WC2 (WC Riga 6)	Plasmazerstäubung	6,2	10-20	35/ 36
WC3 (Aviro-OC-01/13)	Mechanisches Legierungsverfahren	n.b. ⁸	Nano-Phasen- Material	n.b.
WC4 (2013-02 J/G/R)	Plasmazerstäubung	n.b.	10-20	n.b.
WC5 (W ₂ C/C 08/12)	Plasmazerstäubung	6,5	10-20	49/ 43

⁶ Messung vom Hersteller

⁷ Messung vom IKTS

⁸ n.b. = nicht bestimmt

Alle zu testenden Feststoffpartikel der WC-Proben wurden von Herrn Dr. rer. nat. T. Hoyer vom IKTS in D-07629 Hermsdorf zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden in 2-ml-*Tubes* zu jeweils 212,5 mg mithilfe einer Feinwaage (siehe (7), Tab. 2, S. 21) abgewogen. Anschließend erfolgte die Aufnahme in 1700 µl WSH, entsprechend einer Konzentration der Ausgangssuspension von 12,5 % bzw. 125 mg/ml. Die Partikel waren nicht wasserlöslich, jedoch konnte durch kurzes Mischen eine homogene Suspension erzeugt werden. Bis zum Beginn des Suspensionsversuchs wurden die angesetzte Ausgangssuspensionen in einem Thermomixer (siehe (8), Tab. 2, S. 21) bei 1.200 rpm geschüttelt und auf 20 °C temperiert.

4.5.3 Formaldehyd

Entsprechend der Leitlinie wurde FA im Rahmen der FA-Kontrollversuche als DM eingesetzt und kam dabei in einer Konzentration von 0,7 mg/ml zur Anwendung. Zur Herstellung einer Lösung dieser Konzentration wurde eine Stammlösung (siehe -12-, Tab. 4, S. 22) verwendet, welche mit WSH verdünnt wurde. Da der FA-Gehalt der im Handel erhältlichen FA-Lösungen unterschiedlich ist und eine zeit- und lagerungsabhängige Abnahme der Konzentration nicht ausgeschlossen werden kann, ist eine vorausgehende quantitative Bestimmung des FA-Gehalts unverzichtbar. Die Bestimmung des FA-Gehalts erfolgte nach der in der Leitlinie beschriebenen Methode (Rabenau et al. 2015).

4.6 Quantitativer Suspensionsversuch

Bei der Durchführung des quantitativen Suspensionsversuchs wurde die „Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin“ (Rabenau et al. 2015) zur Anleitung und Orientierung genutzt. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden als EWZ 5, 15, 30 und 60 min festgelegt. Ein DM gilt entsprechend der Leitlinie als wirksam, wenn eine Reduktion des Virustiters um mindestens 4 \log_{10} -Stufen $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ erreicht wird (Rabenau et al. 2015). Jede Partikelsuspension wurde gegen jedes Modellvirus in mindestens zwei unabhängigen Einzelversuchen getestet. Bei größeren Abweichungen zwischen beiden Einzelergebnissen ($> 0,5 \log_{10}$ -Stufen $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$) erfolgten weitere, jedoch insgesamt maximal fünf Messungen.

4.6.1 Durchführung

Zur Vorbereitung des Versuchs wurde in den zur Titerbestimmung benötigten Zellkulturen ein Mediumwechsel vollzogen. Dieser wurde vor der Infektion durchgeführt, um die Gefahr einer nachträglichen Viruskontamination in nicht infizierten Kulturen zu vermeiden. Der Mediumwechsel ist notwendig, um ein langes und mindestens bis zum Abschluss der zpE-Entwicklung andauerndes Überleben der Zellen zu gewährleisten.

Für jeden Einzelversuch, mit der zu testenden Partikelsuspension, einschließlich ihrer definierten Konzentration und dem einzusetzenden Modellvirus, wurden drei Testansätze vorbereitet. Hiervon dienten zwei als Kontrollversuche, auf deren Hintergrund und Zusammensetzung im Unterpunkt 4.6.3 eingegangen wird. Im dritten Testansatz erfolgte die Durchführung des Desinfektionsversuchs im engeren Sinne. Zu dessen Herstellung wurden 100 μl Aqua bidest., 800 μl der Partikelsuspension und als letztes 100 μl der Modellvirussuspension in ein Reaktionsgefäß gegeben. Der Inhalt wurde 5 s gemischt (siehe (9), Tab. 2, S. 21) und, um den Beginn der Reaktion zu markieren, die Zeitmessung gestartet. Es gilt zu berücksichtigen, dass der Volumenanteil der verwendeten Modellvirussuspension im Testansatz nur 1/10 beträgt und diese dadurch um den Faktor 10 verdünnt wird. Das bedeutet, dass der Testansatz, bezogen auf die Modellvirussuspension, einer Verdünnung von 10^{-1} entspricht. Ebenso wird die Partikelsuspension um den Faktor 1,25 verdünnt, sodass dies bei der Herstellung der Partikelangangsuspension bedacht werden muss.

Nach Ablauf der jeweiligen EWZ von 5, 15, 30 und 60 min, wurde eine Probe von 100 μl aus dem Testansatz entnommen und sofort zur Weiterverarbeitung verwendet. Die Probe wurde unmittelbar im Verhältnis 1:10 mit 900 μl Medium verdünnt, entsprechend einer Verdünnung von 10^{-2} , und anschließend für 15 s bei 5223 g zentrifugiert (siehe (10), Tab. 2, S. 21). Im

Rahmen der Zentrifugation sedimentierten große und sichtbare Agglomerate der Wirkstoffpartikel, sodass eine Abtrennung des von den Partikeln größtenteils gereinigten und virushaltigen Überstandes möglich war. Dadurch konnte eine Nachwirkung über die EWZ hinaus verhindert und die Zytotoxizität der Wirkstoffpartikel verringert werden. Der das Restvirus enthaltende Überstand wurde weiterverdünnt, wobei dies in Anpassung an den zu erwartenden Virustiter, i.d.R. jedoch von 10^{-2} bis 10^{-11} , erfolgte. Zur Vermeidung von Virusverlusten aufgrund thermischer Einflüsse wurden alle Verdünnungen auf Eis hergestellt. Unmittelbar nach dem Abschluss der Verdünnungsreihe wurden die Verdünnungen auf die am Vortag ausgesäten Zellkulturen aufgetragen, um über den zpE den Virustiter zu ermitteln. In acht Parallelkulturen wurden jeweils 100 µl derselben Verdünnungsstufe überführt.

4.6.2 Bestimmung der Infektiosität

Als Messgröße für den Parameter der Infektiosität wurde der Virustiter als TCID₅₀/ml bestimmt. Dessen Bestimmung erfolgte in einem quantalen Test nach der Endpunktmethode von Spearman (Spearman 1908) und Kärber (Kärber 1931). Dabei wurden die mit den Verdünnungen und jeweils acht Parallelkulturen pro Verdünnungsstufe behandelten Zellkulturen hinsichtlich des Auftretens eines zpE mikroskopisch untersucht. Eine Kultur galt als positiv, sobald kleinste zytopathische Veränderungen erkennbar waren. Aus den so erhobenen Daten konnte der logarithmische Virustiter nach der Formel (siehe Formel 1) von Spearman (Spearman 1908) und Kärber (Kärber 1931) berechnet werden.

Die Endablesung erfolgte an vorher definierten Tagen, welche vom verwendeten Zell-Virus-Kultursystem abhingen und zwischen dem 5. (für MNV auf RAW 264.7) und dem 10. (für HAdV-5 auf A-549) Tag post infectionem (p.i.) lagen. Für die Erhebung zuverlässiger und richtiger Messwerte mussten die Tage so gewählt werden, dass einerseits die Entwicklung des zpE abgeschlossen war und andererseits die als ZK dienenden Kulturen noch keine vom Virus unabhängigen degenerativen Veränderungen aufwiesen.

$$m = x_k + \frac{d}{2} - d \sum p_i \quad SA = \sqrt{d^2 \times \sum \{(p_i \times (1 - p_i)) / (n - 1)\}} \quad 95 \% - KI = 2 \times SA$$

Formel 1: Berechnung des logarithmischen Virustiters in TCID₅₀/ml einschließlich der Standardabweichung und des 95 %-KI

m	= Logarithmus des Virustiters bezogen auf das Testvolumen
x _k	= Logarithmus der kleinsten Verdünnungsstufe, bei der alle acht Parallelkulturen positiv sind
d	= Logarithmus des Verdünnungsfaktors (= 10)
p _i	= Anteil der positiven Kulturen einer Verdünnungsstufe an allen acht Parallelkulturen
SA	= Standardabweichung
n	= Anzahl der Parallelkulturen pro Verdünnungsstufe (= 8)

4.6.3 Kontrollversuche

- Zellkontrolle

Die Zellkontrolle (ZK) diente der Beurteilung des normalen und regelhaften Wachstums der Zellkultur. Degenerative Veränderungen, welche unabhängig von einer Virusinfektion und ab einem bestimmten Zeitpunkt auftreten, können in der ZK erkannt werden. Sie ermöglicht somit eine Unterscheidung von Veränderungen degenerativer und zytopathischer Art. Bei der Beurteilung von infizierten Kulturen hinsichtlich des Auftretens zytopathischer Veränderungen war im Zweifelsfall immer ein Bezug auf die ZK möglich. Das Mitführen einer ZK garantiert eine hohe Sicherheit und Genauigkeit bei der Auswertung. Zu jedem Versuchstag wurden pro 96-Wellplatte mindestens acht ZK mitgeführt. In den Kavitäten der ZK wurden die Zellen ausschließlich mit Medium behandelt.

- Viruskontrolle

Die Viruskontrolle (VK) ermöglicht die Bestimmung des AVT und damit die Berechnung des RF (siehe Formel 2, S. 39). Darüber hinaus liefert sie eine Aussage über die Stabilität des verwendeten Virus. Sie enthält, im Gegensatz zum Prüfmittelansatz, keinen Wirkstoff, sodass hier erwartungsgemäß keine Reduktion des Virustiters stattfinden kann. Kleinere Schwankungen ($\leq 0,5 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) zwischen den Einzelversuchen sind dennoch möglich. Zum Ansetzen der VK wurden 100 µl Aqua bidest., 800 µl WSH anstelle der DM-Suspension und 100 µl Modellvirussuspension vermischt. Der Ansatz der VK wurde ebenso wie alle anderen Ansätze gemischt und anschließend für die Dauer der EWZ bei 1.200 rpm und 20 °C im Thermomixer geschüttelt. Im Gegensatz zum Prüfmittelansatz wurde in der VK nur einmalig der Virustiter bestimmt und zwar am Ende der maximalen EWZ von 60 min. Da die VK zu den unverzichtbaren und notwendigen Kontrollversuchen gehört, wurde sie an jedem Versuchstag mitgeführt.

- Zytotoxizitätskontrolle

Die Zytotoxizitätskontrolle (ZT) überprüft eine potenzielle Toxizität der Prüfsubstanz gegenüber der verwendeten Zellkultur. Durch sie kann sichergestellt werden, dass durch die Prüfsubstanz bedingte zelltoxische Effekte nicht fälschlicherweise als zpE erkannt werden. Sie gehört ebenfalls zu den obligatorischen Kontrollversuchen und wurde bei jedem Einzelversuch und für jede Prüfsubstanz sowie für verschiedene Konzentration derselben mitgeführt. Der Testansatz enthielt 100 µl Aqua bidest., 800 µl des zu testenden Wirkstoffs und weitere 100 µl Aqua bidest. anstelle der Modellvirussuspension. Das Ansetzen erfolgte gemeinsam mit dem dazugehörigen Prüfmittelansatz aus Wirkstoff- und Virussuspension.

- Formaldehyd-Kontrolle

FA ist ein allgemein anerkanntes DM, dessen Wirksamkeit gegen Viren gut untersucht ist (McDonnell und Russell 1999). Um die Gültigkeit der Testergebnisse zu zeigen, muss FA als Kontrolle mitgeführt und eine Wirkung innerhalb bestimmter Grenzen nachgewiesen werden. Die FA-Kontrolle war sporadisch und nicht an jedem Tag Teil der Versuche, wurde jedoch mindestens zweimal mit jedem Modellvirus durchgeführt. Im Gegensatz zu allen anderen getesteten Substanzen handelt es sich bei FA um eine wasserlösliche Verbindung, sodass die Beendigung der Testansätze nach Ablauf der EWZ durch eine andere Methode, als die bisher eingesetzte Zentrifugation, herbeigeführt werden musste. Es kam ein Trennungsverfahren auf der Basis der Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration) (siehe S. 22, Tab. 3, [7]) zur Anwendung. Im Testansatz waren 500 µl einer 1,4 %-igen FA-Lösung, 400 µl PBS sowie 100 µl der jeweiligen Modellvirussuspension enthalten. Um auszuschließen, dass der Virusnachweis durch die Verwendung der Gelfiltrationssäulen beeinträchtigt wird, wurde eine zur FA-Kontrolle separate VK mitgeführt, die ebenfalls über die Säule geleitet wurde. In gleicher Weise wurde auch mit der ZT zur Bestimmung der Zytotoxizität von FA verfahren. Im Unterschied zum obigen Ansatz wurden im Fall der VK 500 µl FA-Lösung durch 500 µl WSH ersetzt und im Fall der ZT 100 µl Modellvirussuspension durch 100 µl Aqua bidest. ersetzt.

4.6.4 Statistische Auswertung

Für jede mögliche Kombination von Wirkstoff, Wirkstoffkonzentration, Modellvirus und EWZ wurden mindestens zwei voneinander unabhängige Einzelversuche, entsprechend einer Stichprobenmenge von $N = 2$, durchgeführt. Dabei wurden in jedem Einzelversuch AVT, Restvirustiter (RVT), RF und Zytotoxizität und damit insgesamt vier Parameter erhoben. Der RF errechnet sich als Differenz von AVT und RVT (siehe Formel 2).

$$RF = m_{AVT} - m_{RVT} \quad 95 \% - KI_{RF} = \sqrt{(2 \times SA_{m_{AVT}})^2 + (2 \times SA_{m_{RVT}})^2}$$

Formel 2: Berechnung des logarithmischen RF in TCID₅₀/ml einschließlich seines 95 %-KI

m_{AVT} = Logarithmus des AVT, gemessen in der VK
 m_{RVT} = Logarithmus des RVT, gemessen im Prüfmittelansatz
SA = Standardabweichung

Die Versuche wurden, in Abhängigkeit der ermittelten RF und bei einer Differenz $> 0,5 \log_{10}$ TCID₅₀/ml, bis zu einer maximalen Stichprobenmenge von $N = 5$ wiederholt. Für die

Parameter des AVT, des RVT, des RF und der Zytotoxizität erfolgte anschließend die Bildung des arithmetischen Mittelwerts über einer Stichprobe einschließlich der Standardabweichung und des 95 %-KI. Die dabei verwendeten Formeln sind in Tab. 12 dargestellt.

Tab. 12: Berechnung von Mittelwert und 95 %-KI. Die Formeln zeigen die Berechnung exemplarisch für den RF. Analog wurden auch die Berechnungen für den AVT, den RVT und die Zytotoxizität durchgeführt.

Lage-/Streuungsmaße	Formel
Arithmetischer Mittelwert des RF (M_{RF})	$M_{RF} = \frac{RF_1 + RF_2 + RF_N}{N}$
95 %-KI des mittleren RF	$95 \% - KI_{M_{RF}} = \sqrt{\frac{(95 \% - KI_{RF_1})^2 + (95 \% - KI_{RF_2})^2 + (95 \% - KI_{RF_N})^2}{N}}$

⁹ N bezeichnet die Stichprobenmenge bzw. die Anzahl durchgeführter Einzelversuche

Statistische Tests wurden zur Klärung verschiedener Fragestellungen und zur Absicherung relevanter Unterschiede zur Hilfe genommen. Primär galt es, den RF für jede Stichprobe hinsichtlich seiner Wirksamkeit zu überprüfen, wobei dies unter Anwendung eines Einstichproben-T-Tests realisiert wurde. Ein solcher Test vergleicht die mittleren RF gegenüber dem Testwert 4 und gibt an, ob diese signifikant $>$ bzw. $< 4 \log_{10}$ TCID₅₀/ml sind und per definitionem das Wirksamkeitskriterium erfüllen. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha \leq 0,05$ zugrundegelegt.

Zur Abklärung des Einflusses von EWZ und Wirkstoffkonzentration wurden jeweils einfaktorielle Varianzanalysen verwendet, welche die Streuung innerhalb und zwischen den Stichproben ins Verhältnis setzen und diesen Unterschied auf Signifikanz testen. Dadurch kann der Einfluss eines unabhängigen Faktors auf den RF zum jeweiligen Signifikanzniveau bestätigt oder widerlegt werden. Dieses wurde auf $\alpha \leq 0,05$ festgelegt.

Relevante Unterschiede der RF bei verschiedenen Modellviren sowie bei verschiedenen Wirkstoffen wurden durch paarweise Vergleiche unter Anwendung eines Zwei-Stichproben-T-Tests und anschließender Bonferroni-Adjustierung des Signifikanzniveaus α identifiziert. Unter der Annahme, dass tatsächliche Unterschiede unabhängig von der EWZ auftreten, wurden die Stichproben aller oder mehrerer EWZ als Mittelwerte zusammengefasst. Besonderheiten ergaben sich hierbei durch den Umstand, dass bei bestimmten Modellviren sowie Wirkstoffen zu EWZ von 30 und 60 min methodische Limitationen wirksam wurden,

die eine vollständige Darstellung des RF verhinderten. Solche Daten ermöglichen keinen sinnvollen Vergleich und wurden dementsprechend ausgeschlossen. Die betreffenden Fälle, bei denen dies notwendig war, werden bei der Präsentation der Ergebnisse an der entsprechenden Stelle genannt. Entsprechend der Bonferroni-Adjustierung wurde bei Modellvirusvergleichen ein Signifikanzniveau von $\alpha \leq 0,008$ festgelegt, während dieses bei Wirkstoffvergleichen $\leq 0,001$ für MVA und $\leq 0,003$ für alle anderen Modellviren betrug.

4.7 Lichtmikroskopie

- Herstellung und Fixierung der Proben

Die Kavitäten einer 24-Wellplatte wurden mit Deckgläsern (siehe [8], Tab. 3, S. 22) bestückt, um anschließend darauf Zellen auszusäen. Am Folgetag erfolgte die Infektion der Zellen, wobei eine MOI von 0,1 und 1,0 gewählt wurde. Parallel wurden nicht infizierte Zellkulturen als ZK mitgeführt. Die infizierten Zellkulturen wurden täglich auf das Auftreten eines zpE kontrolliert. Bei einem ausreichenden und zur Bilddarstellung geeigneten zpE (vierfach positiv) wurden die Zellkulturen fixiert und auf Objektträger gebracht. Die Fixierung erfolgte nach Abnahme des Überstandes durch Zugabe von 400 µl einer 4 %-igen Paraformaldehyd-Lösung (siehe -13-, Tab. 4, S. 22) und anschließende Inkubation für 15 min bei 5 °C. Schließlich wurde das Fixativ entfernt und durch 800 µl PBS ersetzt. Insgesamt wurden die Proben dreimal gewaschen, wobei PBS für jeweils 5 min auf den fixierten Zellkulturen belassen wurde. Abschließend konnte das Deckglas aus der Kavität entnommen werden und auf einem Objektträger mithilfe eines Tropfens Eindeckmedium eingebettet werden. Die Präparate waren sofort mikroskopierfähig. Für alle eingesetzten Modellviren wurden Präparate hergestellt, welche den z.T. sehr charakteristischen zpE zeigen.

- Mikroskopie und Aufnahme von Bildern

Alle Präparate wurden bei 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung mikroskopiert und fotografiert. Es wurde ein aufrechtes Durchlichtmikroskop (siehe (11), Tab. 2, S. 21) verwendet, welches zur Aufnahme der Bilder zusätzlich mit einer CCD-Kamera (siehe (12), Tab. 2, S. 21) ausgestattet war.

4.8 Quantitative Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction

4.8.1 Grundlagen

Die q-RT-PCR ermöglicht die Quantifizierung eines nachzuweisenden DNA-Fragments in einer Probe. Dabei kann die nachgewiesene Menge als Kopien bzw. Teilchen/µl angegeben werden. Die Quantifizierung erfolgt auf der Basis einer Fluoreszenzmessung, indem den

Proben ein Fluorophor zugesetzt wird. Dieses Molekül kann nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, Licht einer anderen spezifischen Wellenlänge emittieren und besitzt die Fähigkeit, unspezifisch doppelsträngige DNA zu binden. Die gemessene Fluoreszenz ist folglich direkt proportional zur DNA-Konzentration der Probe (McPherson und Moller 2000). Der *Cycle-Threshold* (Ct)-Wert beschreibt einen Schwellenwert und zeigt die jeweilige Zykluszahl der PCR an, bei der die Fluoreszenz erstmals signifikant von der normalen Hintergrund-Fluoreszenz abweicht. Dies trifft zu, sobald die exponentiell verlaufende Phase der PCR, welche mit einem rapiden Anstieg der Fluoreszenz einhergeht, erreicht ist (Kubista et al. 2006). Aus der Anzahl abgelaufener Zyklen bis zum Erreichen der exponentiellen Phase kann demnach die DNA-Konzentration geschätzt werden. Eine niedrige Zykluszahl bedeutet eine hohe DNA-Konzentration, wohingegen eine hohe Anzahl von Zyklen einer geringen DNA-Konzentration entspricht. Durch die Messung des Ct-Wertes für mehrere Proben mit bekannten DNA-Konzentrationen (Standards) kann eine Eichgerade erzeugt werden, auf der jedem Ct-Wert eine Konzentration zugeordnet wird. Schließlich kann daraus eine lineare Gleichung ermittelt werden, welche die direkte Berechnung der DNA-Konzentration aus dem gemessenen Ct-Wert ermöglicht. Statistisch entspricht dieses Verfahren der linearen Regression, dessen Anwendung aufgrund der strengen Proportionalität von Ct-Wert und DNA-Konzentration gerechtfertigt ist.

4.8.2 Probengenerierung

- Eichgerade

Eine Probe einer im ZKÜ erzeugten Suspension des PV-1 wurde zunächst den Schritten der RNA-Extraktion und cDNA-Synthese unterzogen (siehe 4.8.3). Anschließend wurde zum qualitativen Nachweis des viralen Genoms eine PCR (siehe (13), Tab. 2, S. 21) durchgeführt, deren Produkt mithilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (siehe [9], Tab. 3, S. 22) aufgereinigt wurde. Die DNA-Konzentration der Lösung wurde am Photometer (siehe (14), Tab. 2, S. 21) in ng/μl gemessen und nach der folgenden Formel in Kopien/μl umgerechnet:

$$\begin{aligned}
 & [DNA] \frac{\text{Kopien}}{\mu\text{l}} \\
 &= \frac{[DNA] \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times \text{Avogadro-Konstante } (6,022 \times 10^{23}) \frac{\text{Teilchen}}{\text{mol}}}{\text{Nukleotide des Fragments} \times 10^9 \times \text{mittlere Molmasse eines Nukleotids } (308,95) \frac{\text{g}}{\text{mol}}}
 \end{aligned}$$

Formel 3: Umrechnung der DNA-Konzentration von ng/μl in Kopien/μl

Aus der Lösung wurde eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:10 von 10^2 bis 10^9 Kopien/ μ l angelegt. Die Verdünnungen mit bekannten Kopienzahlen dienten in einer sich anschließenden q-RT-PCR als Standards zur Ermittlung des Ct-Wertes.

- Quantitativer Suspensionsversuch

Zur Erfüllung des Experiments ging der q-RT-PCR ein quantitativer Suspensionsversuch voraus, welcher der Probenrekrutierung diene. Die Versuchsdurchführung war mit der in 4.6 beschriebenen Vorgehensweise identisch mit der Ausnahme, dass die Testbedingungen auf einen einzigen Ansatz mit exemplarischem Charakter reduziert wurden. Hierfür wurden WC1 als Wirkstoff, 15 min als EWZ und PV-1 als Modellvirus ausgewählt. Parallel zur Messung der DNA-Konzentration wurden die Proben einer Virustitration auf Zellkulturen unterzogen. Zur Beendigung der Wirkung wurden die Reaktionsansätze nach Ablauf der EWZ zentrifugiert (für 15 s bei 5223 g). Das Sediment des Prüfmittelansatzes, welches die WC-Partikel von WC1 sichtbar enthielt, wurde, im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen, nicht verworfen. Stattdessen erfolgte eine Resuspension in 100 μ l Aqua bidest., 800 μ l WSH und 100 μ l Kulturmedium. Nach Wiederaufmischen des Sediments wurde die Probe zur separaten Messung von DNA-Konzentration und Virustiter geteilt. Beide Teile wurden anschließend kontinuierlich im Thermomixer durchmischt (für 30 min bei 1.200 rpm und 6-8 °C), um im Sediment eingeschlossenes Restvirus wieder freizusetzen. Damit wurde das Sediment erstmalig einer Virustitration zugeführt, wobei streng genommen in einem zweiten Überstand gemessen wurde. Die WC-Partikel können nicht direkt auf Zellkulturen gegeben werden, da eine mikroskopische Beurteilung dann unmöglich wäre. Für den aus dem Prüfmittelansatz gewonnenen Überstand und für die VK wurde ähnlich verfahren mit der Ausnahme, dass eine Durchmischung für 30 min nicht erforderlich war. Alle drei Proben, die sich aus zwei verschiedenen Testansätzen rekrutieren, sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tab. 13: Probenrekrutierung für q-RT-PCR.

Bezeichnung des Testansatzes	Bezeichnung der Probe	Gemessene Parameter
Testansatz VK (enthält PV-1)	Überstand VK	Ausgangsvirus-RNA/-Titer
Testansatz Prüfmittel (enthält PV-1 und WC1)	Überstand Prüfmittelansatz	Restvirus-RNA/-Titer
	Sediment Prüfmittelansatz	Restvirus-RNA/-Titer

Die Proben wurden nach ihrer endgültigen Gewinnung auf Eis gelagert und danach zügig weiterverarbeitet. Es wurden insgesamt drei solcher Versuche zur Probengewinnung für eine q-RT-PCR unternommen.

4.8.3 Weiterverarbeitung der Proben

- RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurde ein kommerziell erhältliches Kit (siehe [10], Tab. 3, S. 22) verwendet. Im ersten Extraktionsschritt, welcher der Lyse der Virionen entspricht, wurden 200 µl der Probe mit 200 µl Puffer und 25 µl Protease vermischt und anschließend für 15 min bei 56 °C inkubiert. Der freigesetzten RNA wurden 250 µl Ethanol zugegeben, worauf eine erneute Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur folgte. Die Probe wurde zur Aufreinigung auf eine Adsorptionssäule aufgetragen, in der die RNA-Moleküle in Gegenwart von Ethanol an eine Membran aus Silikagel (= Kieselgel) binden. Mithilfe zweier verschiedener Waschpuffer, die zu jeweils 500 µl auf die Säule gegeben wurden, und anschließender Zentrifugation (für 1 min bei 6.081 g (siehe (15), Tab. 2, S. 21)) wurde die RNA von viralen Proteinen und anderen Fremdmolekülen getrennt. Danach wurde erneut Ethanol zugeben, jetzt 500 µl, und die Säule durch mehrfache Zentrifugation und Inkubation mit offenem Deckel bei 56 °C getrocknet. Zur Desorption der RNA wurden 50 µl Elutionspuffer zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur auf der Säule belassen. Die Elution erfolgte durch Zentrifugation (für 1 min bei 16.060 g), wobei für jede Probe 50 µl RNA-Lösung in einem neuen Gefäß aufgefangen wurden.

- cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese kam ebenfalls ein kommerziell vertriebenes Kit (siehe [11], Tab. 3, S. 22) zur Anwendung. Im Syntheseansatz wurden zunächst 10 µl des RNA-*Templates* mit jeweils 1 µl einer Mischung von Desoxyribonukleotiden (dNTPs) und den *Primern* vermischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 65 °C wurden 4 µl Puffer, 2 µl einer 0,1 M-Dithiothreitol-Lösung und 1 µl eines RNase-Inhibitors zur Stabilisierung der RNA zugegeben. Diesem Ansatz wurde nach zweiminütiger Inkubation bei 42 °C als letztes 1 µl der Reversen Transkriptase hinzugefügt, womit die Reaktion gestartet wurde und für 50 min bei 42 °C lief. Zur Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase wurde der Ansatz für 15 min bei 70 °C inkubiert. Die in äquivalenter Menge zur RNA entstandene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

- Vorbereitung der q-RT-PCR-Ansätze

Zur Herstellung der Reaktionsansätze wurden vier Hauptbestandteile miteinander vermischt. Hierzu gehörten Diethylpyrocarbonat-Wasser, das Primerpaar, der *SYBR-Green-Mix* (siehe -14-, Tab. 4, S. 22) und das cDNA-Template, welches als letztes zugegeben wurde. Der *SYBR-Green-Mix* enthält u.a. den Farbstoff *SYBR Green I*, welcher unspezifisch doppelsträngige DNA bindet und damit die Detektion ermöglicht. Es handelt sich um einen weit verbreiteten und in der Anwendung etablierten DNA-Farbstoff (Zipper et al. 2004). Die Bestandteile der Reaktionsansätze einschließlich der jeweiligen Volumenanteile sind in Tab. 14 dargestellt.

Tab. 14: Zusammensetzung der q-RT-PCR-Ansätze.

	Substanz	Volumen im Reaktionsansatz
Master Mix	Diethylpyrocarbonat-Wasser	3 µl
	Primer Forward „EP1“ (10 µM)	0,5 µl
	Primer Reverse „EP4“ (10 µM)	0,5 µl
	SYBR-Green-Mix ¹⁰	5 µl
Template	cDNA	1 µl
<u>Summe</u>		<u>10 µl</u>

¹⁰ SYBR-Green-Mix enthält:
 1. *SYBR Green I*
 2. hitzestabile DNA-Polymerase, (die durch Hitze aktiviert wird)
 3. dNTPs

4. PCR-Puffer
 5. MgCl₂

Die verwendeten *Primer* (siehe Tab. 15) mit der Bezeichnung „EP1“ (*Forward*) und „EP4“ (*Reverse*) wurden zur Etablierung einer Enterovirus-PCR am Institut für Virologie und Antivirale Therapie in Jena synthetisiert. Das durch die *Primer* demarkierte DNA-Fragment besitzt eine Länge von 413 Basenpaaren.

Tab. 15: Primerpaar für Enterovirus-PCR mit Sequenz und Angabe der Position im Genom.

<i>Primer Forward</i> „EP1“	5' – 64 – CGG TAC CTT TGT GCG CCT GTT – 84 – 3'
<i>Primer Reverse</i> „EP4“	5' – 464 – CGC CGA TTA GGA TTG ACG CC – 483 – 3'

Der Ct-Wert wurde für jede Probe als Mittelwert eines Triplikats bestimmt. Zur Vereinfachung wurden daher, anstelle des in Tab. 14 dargestellten einfachen Ansatzes, dreifache Ansätze hergestellt. Diese enthielten demnach insgesamt 30 µl und wurden zu

jeweils 10 µl in drei Kavitäten einer 96-Well-PCR-Platte (siehe [12], Tab. 3, S. 22) verteilt. Die Platte wurde mithilfe einer Klebefolie verschlossen und konnte nach kurzem Abzentrifugieren (für 30 s bei 152 g (siehe (16), Tab. 2, S. 21)) im Real-Time-PCR-Gerät platziert werden.

4.8.4 Durchführung der Messung

Zur Durchführung der q-RT-PCR kam ein modernes Real-Time-PCR-Gerät (siehe (17), Tab. 2, S. 21) zum Einsatz. Eine qualitative Enterovirus-PCR mit dem eingesetzten *Primerpaar*, welches auch für den Nachweis von PV-1 sensitiv ist, war bereits am Institut für Virologie und Antivirale Therapie in Jena etabliert worden, sodass auf das entsprechende Protokoll (siehe Tab. 16) zurückgegriffen werden konnte.

Tab. 16: Verwendetes q-RT-PCR-Protokoll.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Enzymaktivierung Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	
Denaturierung	94 °C	45 s	35x
<i>Annealing</i>	56 °C	45 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Verlängerte Elongation	72 °C	10 min	
Schmelzkurve	50-95 °C	0,2 °C/ s (Aufheizrate)	
Kühlung	20 °C	3 min	

Am Ende der PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse zur Spezifitätskontrolle durchgeführt. Hierbei wurden die Reaktionsansätze zunächst auf 50 °C gekühlt und anschließend mit einer Aufheizrate von 0,2 °C pro s auf eine Maximaltemperatur von 95 °C erhitzt. Währenddessen erfolgte eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung. Idealerweise kommt es ab einer bestimmten Temperatur, die der spezifischen Schmelztemperatur des nachgewiesenen DNA-Fragments entspricht, zu einer plötzlichen und rapiden Abnahme der Fluoreszenz. Dies ist dadurch bedingt, dass der Farbstoff nur an doppelsträngige DNA bindet, welche im Rahmen der kontinuierlichen Erhitzung zunehmend und bei Erreichen der spezifischen Schmelztemperatur schließlich schlagartig denaturiert. Falls außer dem nachzuweisenden DNA-Fragment noch weitere unspezifische Produkte entstanden sind, kann dies im Rahmen der Schmelzkurvenanalyse erkannt werden. Auch unspezifische Produkte gehen in das Ergebnis der quantitativen Messung ein, sodass falsch-hohe Werte die Folge sein können.

5 Ergebnisse

5.1 Quantitativer Suspensionsversuch

5.1.1 Bewertung der Kontrollversuche

In der Leitlinie der DVV und des RKI zur Prüfung von chemischen DM in der Humanmedizin werden Kontrollversuche gefordert. Diese dienen im Wesentlichen dem Ausschluss anderer Einflüsse als dem der Prüfsubstanz auf die beobachtete Virusreduktion. Von den insgesamt sechs in der Leitlinie beschriebenen Versuchen wurden vier durchgeführt. Darunter befinden sich die Versuche der ZK, der VK, der ZT und der FA-Kontrolle.

Die mitgeführten ZK zeigten bei allen Versuchen bis zum letzten Tag der Ablesung intakte Monolayer der jeweiligen Zelllinie und ließen eine klare Unterscheidung zwischen nicht-infizierten und infizierten Zellkulturen zu.

Für die VK liegen Virustiter vor, deren 95 %-KI stets $\leq 0,50 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ sind und damit den Anforderungen der Leitlinie genügen. Im Rahmen der Untersuchungen der WC-Partikel ergaben sich für MVA Viruskontrolltiter mit einem Mittelwert von $8,48 \pm 0,39 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Diese Titer konnten nach vorausgegangener Virusanreicherung durch UZ erreicht werden. Bei den getesteten SiNPs wurden niedrigere Viruskontrolltiter des MVA gemessen, da hier keine aufkonzentrierten Virussuspensionen verwendet wurden. Sie bewegen sich bei einem Mittelwert von $7,65 \pm 0,45$ in einem Bereich von 7,38 bis $8,00 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Für die anderen Viren ergaben sich Mittelwerte von $10,00 \pm 0,47$ bei HAdV-5, $9,34 \pm 0,49$ bei PV-1 und $10,11 \pm 0,41 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ bei MNV. Während bei HAdV-5 und PV-1 bereits ohne Konzentrierungsverfahren ausreichend hohe Titer vorlagen, war bei MNV, ähnlich wie bei MVA, eine UZ erforderlich. Einer besonderen Erklärung bedürfen die Viruskontrolltiter, welche als Teil der FA-Kontrolle erhoben wurden. Diese sind, trotz gleicher Viruspassage, für alle getesteten Viren in einem Bereich zwischen 1,82 bei MVA und $0,19 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ bei MNV niedriger, als die o.g. Virustiter. Es ergaben sich dabei Mittelwerte in Höhe von $6,72 \pm 0,39$ bei MVA, $9,57 \pm 0,37$ bei HAdV-5, $8,88 \pm 0,39$ bei PV-1 und $9,92 \pm 0,42 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ bei MNV. Eine Gegenüberstellung der Viruskontrolltiter von Regelversuchen und FA-Kontrollen zeigt Tab. 17 (S. 48). Wahrscheinlich sind die beschriebenen Differenzen durch die Verwendung von Gelfiltrationssäulen zu erklären, welche im Rahmen der FA-Kontrolle zum Einsatz kamen. Offensichtlich kann deren Einsatz auch zu einer Retention von Viren führen, sodass die Virustiter falsch-niedrig gemessen werden. Das Ausmaß der Retention scheint dabei in Abhängigkeit der Virusart unterschiedlich zu sein und war bei MVA am größten.

Tab. 17: Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten Kontrollversuche. Angabe der Daten als Mittelwerte mit 95%-KI bei einer Stichprobenmenge von $N \geq 2$.

Modell-virus/ Zelllinie	Prüf-substanz	Viustiter der VK (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	Zytotoxizitäts- titer der ZT (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	RF der FA-Kontrolle (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) einschließlich der statistischen Signifikanz (p-Wert) für RF > bzw. < 4 n.s. = nicht signifikant, $\alpha \leq 0,05$		EWZ (min)
MVA (UZ)/ BHK-21	WC1-5	8,48 ± 0,39	≤ 3,70	2,25 ± 0,41	<0,001	5
	Si1-4	7,65 ± 0,45	≤ 2,75	≥ 2,54	<0,001	15
	FA	6,72 ± 0,39	≤ 4,50	≥ 2,54	<0,001	30
				≥ 2,34	0,002	60
HAdV-5 (ZKÜ)/ A-549	WC1-5	10,00 ± 0,47	≤ 3,55	1,88 ± 0,47	0,025	5
	FA	9,57 ± 0,37	≤ 4,50	3,94 ± 0,45	n.s.	15
				4,81 ± 0,49	n.s.	30
				≥ 5,07	0,040	60
PV-1 (ZKÜ)/ BGM	WC1-5	9,34 ± 0,49	≤ 2,71	0,07 ± 0,51	0,015	5
	FA	8,88 ± 0,39	≤ 4,50	1,07 ± 0,58	0,022	15
				1,44 ± 0,65	0,029	30
				2,26 ± 0,56	0,036	60
MNV (UZ)/ RAW 264.7	WC1-5	10,11 ± 0,41	≤ 3,36	0,83 ± 0,57	0,001	5
	FA	9,92 ± 0,42	≤ 4,83	1,41 ± 0,56	0,002	15
				2,08 ± 0,53	0,003	30
				2,92 ± 0,54	0,010	60

Die Zytotoxizität der getesteten Wirkstoffe umfasste die Virusverdünnungen 10^{-1} bis 10^{-4} und zeigte einerseits Unterschiede zwischen den Wirkstoffen, andererseits aber auch innerhalb eines Wirkstoffs und gegen verschiedene Zelllinien. Zur besseren Übersicht wurden bei der Analyse der Daten Gruppen gebildet, sodass in Tab. 17 die mittlere Zytotoxizität einer Wirkstoffgruppe gegenüber den verschiedenen Zelllinien dargestellt ist. Die höchste Zytotoxizität wurde für FA beobachtet, obwohl Maßnahmen zur Gegenregulation (Gelfiltration) unternommen wurden. Diese war gegenüber den RAW 264.7-Zellen am stärksten ausgeprägt und nahm bei einem Mittelwert von $\leq 4,83$ Einzelwerte bis $\leq 5,50$ log₁₀ TCID₅₀/ml an. Bei den anderen Zelllinien wurde eine ähnliche Zytotoxizität des FA festgestellt. An zweiter Stelle stehen die WC-Partikel, wobei eine erhebliche Variation in Abhängigkeit der jeweiligen Probe beobachtet wurde. Dies zeigt auch ein relativ breiter

Bereich mit einem Minimum von $\leq 2,50$ bei WC5 und einem Maximum von $\leq 4,50 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ bei WC3. Am empfindlichsten stellten sich die BHK-21-Zellen dar, bei denen der für die WC-Partikel bestimmte Mittelwert $\leq 3,70 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ betrug. Als relativ robust präsentierten sich demgegenüber die BGM-Zellen, auf denen die WC-Partikel einen mittleren Zytotoxizitätstiter von $\leq 2,71 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ aufwiesen. Die insgesamt geringste Zytotoxizität zeigten die SiNPs, wobei bei BHK-21-Zellen ein Mittelwert in Höhe von $\leq 2,75 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ bestimmt wurde. Für andere Zelllinien liegen bei den SiNPs zur Zytotoxizität keine Messungen vor. In der Zusammenschau ergibt sich erneut die Feststellung, dass eine hohe Zytotoxizität bei gleichzeitig niedrigem AVT einen limitierenden Faktor für die Bestimmung von RVT und RF darstellt. Unterhalb der festgestellten Zytotoxizitätsgrenze können keine Virustiter gemessen werden, sodass in diesen Fällen der Virustiter mit „ \leq “ bzw. der RF mit „ \geq “ angegeben wird. Bei der Mittelung von Ergebnissen wurden Mittelwerte nur dann mit „ \geq “ angegeben, wenn dies für alle Einzelergebnisse zutraf.

Entsprechend der Leitlinie wurden außerdem Kontrollversuche mit 0,7 %-igem FA gegenüber allen Modellviren durchgeführt. HAdV-5 wurde dabei als einziges Virus mit einem mittleren RF von $4,81 \pm 0,24 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ nach 30 min zuverlässig inaktiviert, während die gegenüber den anderen Viren gemessenen RF die Wirksamkeitsgrenze nicht überschreiten konnten (siehe Abb. 9, S. 50). Für MVA, bei dem der höchste Mittelwert des RF $2,54 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ betrug, muss ein durch verschiedene Faktoren stark limitierter Nachweis der Virusreduktion berücksichtigt werden. Als limitierend gelten in diesem Fall die hohe Zytotoxizität von FA und die relativ zu niedrigen AVT von MVA. Für die anschließend beschriebenen Modellvirusvergleiche bedeutet dies ebenfalls eine extreme Einschränkung, da Vergleiche unter Beteiligung von MVA nur bei einer EWZ von 5 min sinnvoll sind und entsprechend durchgeführt wurden. Da der tatsächliche viruzide Effekt von FA gegenüber MVA wahrscheinlich weit über den beschriebenen RF hinausgeht, bedürfen die erhobenen Daten einer ausführlichen Diskussion. Für PV-1 konnte nach 30 min eine Reduktion um $1,44 \pm 0,65$ und nach 60 min um $2,26 \pm 0,56 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ nachgewiesen werden. Diese Werte liegen innerhalb des in der Leitlinie vorgeschlagenen Bereichs. Für MNV wurden mittlere RF von $0,83 \pm 0,57$ nach 5 bis $2,92 \pm 0,54 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ nach 60 min festgestellt. Damit zeigen MNV und PV-1 eine ähnliche Resistenz gegenüber FA und werden beide relativ langsam inaktiviert. Dennoch existieren bezüglich des RF zwischen allen Modellviren, ausgenommen zwischen MVA und HAdV-5, signifikante Unterschiede. Daraus ergibt sich bei FA ein insgesamt heterogenes Wirkspektrum mit einer besseren Inaktivierung von MVA im Vergleich gegenüber PV-1 und MNV (jeweils $p < 0,001$). Dies gilt in gleicher Weise für

HAdV-5 (jeweils $p < 0,001$), während beim Vergleich von PV-1 und MNV letzteres signifikant besser inaktiviert wird ($p < 0,001$). Abb. 9 fasst die für FA bestimmten RF und damit auch alle vorgenommenen Vergleiche in graphischer Darstellung zusammen.

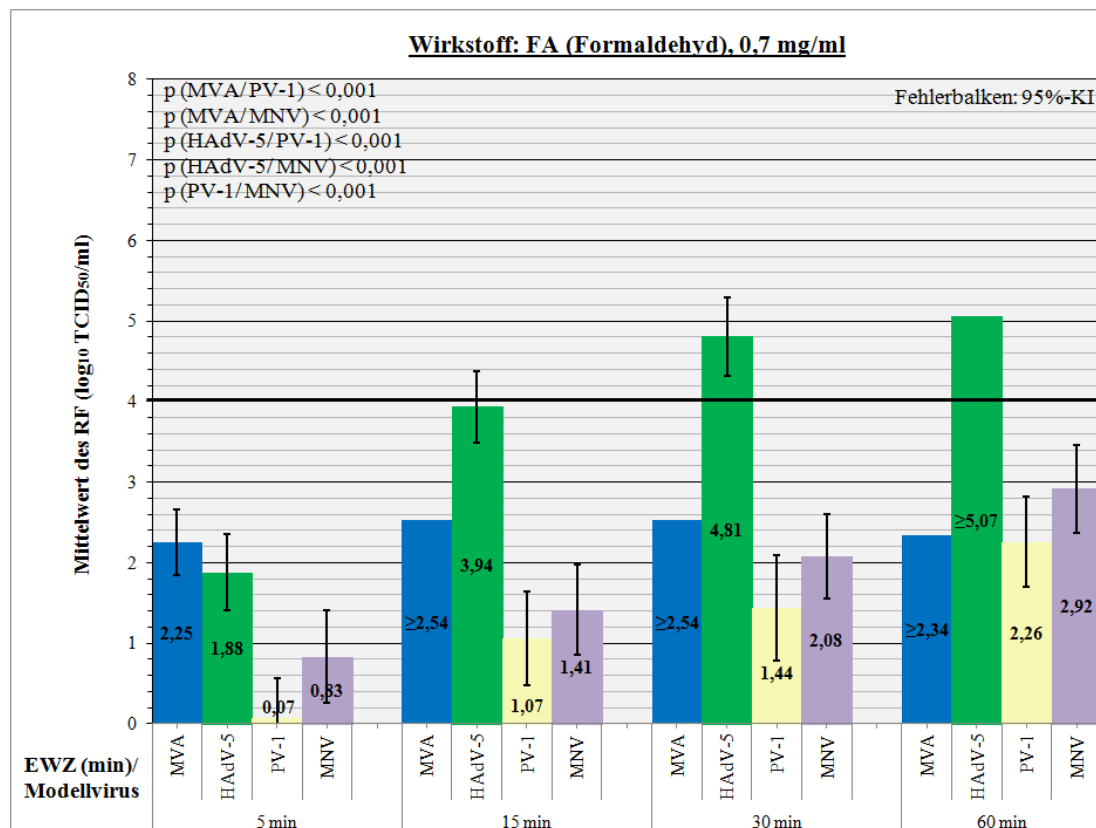


Abb. 9: Darstellung der ermittelten RF für FA in Abhängigkeit von EWZ und Modellvirus.
Angabe der RF als Mittelwerte einer Stichprobe.

Zwei der sechs geforderten Kontrollversuche wurden nicht durchgeführt. Auf eine Nachwirkungskontrolle wurde ebenso verzichtet, wie auf die Interferenzkontrolle. Dadurch bedingt, dass es sich bei allen Wirkstoffen (FA ausgenommen) um Feststoffpartikel handelt, welche am Ende der EWZ abzentrifugiert und dadurch aus dem Testgemisch entfernt wurden, konnte eine Nachwirkung weitgehend ausgeschlossen werden. In ähnlicher Weise gilt dies auch für die Interferenzkontrolle. Die Partikel kommen mit den Zellen nicht in Kontakt, sodass die Zellsuszeptibilität gegenüber dem Virus unbeeinflusst bleibt. Die Durchführung dieser Kontrollen erschien daher nicht verhältnismäßig. Die gesparten zeitlichen und materiellen Ressourcen wurden stattdessen zugunsten höherer Versuchszahlen und zur Ausdehnung und Erweiterung der Versuchsbedingungen genutzt.

5.1.2 Silizium-Nanostrukturen (IPHT, Jena)

Die in PBS aufgenommenen Silizium-Nanostrukturen präsentierten sich als fein verteilte Suspensionen, welche makroskopisch homogen erschienen und farblich durch ein trübes und milchiges Braun charakterisiert waren. Die Suspensionen waren bezüglich des Umgangs unkompliziert und ließen sich gut pipettieren. Bei pH-Werten zwischen 7,00 (Si4) und 7,26 (Si3) konnte zumindest eine hierdurch bedingte Zytotoxizität ausgeschlossen werden.

Für insgesamt vier Proben (Si1-Si4) wurden die RF gegenüber dem Modellvirus MVA bei EWZ von 5, 15, 30 und 60 min ermittelt. Die einzelnen Proben unterschieden sich in Herstellungsmethode und Konzentration, wobei im Wesentlichen zwischen mesoporösen SiNPs und faserähnlichen SiNWs differenziert werden muss. Für alle Proben konnte im Rahmen der Zentrifugation eine geringe Sedimentation der Si-Nanostrukturen festgestellt werden. Das Sediment erschien dabei als feiner Niederschlag entlang der Gefäßwand.

5.1.2.1 Si1 (mesoporöse SiNPs + PBS (1:16)), 0,8 mg/ml

Bei Si1 betrug die Konzentration im Reaktionsansatz 0,8 mg/ml. Hierunter zeigte sich gegenüber MVA eine mittlere Virusreduktion zwischen höchstens $0,96 \pm 0,57$ nach 15 min und wenigstens $0,71 \pm 0,60 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ nach 60 min. Diese Virusreduktion ist, i.S.e. Abweichung vom Wert Null, für EWZ von 5 bis 60 min signifikant (siehe Tab. 19, S. 71). Zusätzlich geht dies auch aus Abb. 10 (S. 52) hervor, in der die dazugehörigen 95 %-KI den Wert Null nicht einschließen. Die Beobachtungen belegen eine virusreduzierende Wirkung von Si1 gegen MVA, die jedoch sehr schwach ausgeprägt ist. Demgegenüber konnte eine Wirksamkeit i.S.e. Virusreduktion um mehr als $4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ nicht erreicht werden, sodass die Anforderungen für ein DM aufgrund dieser Ergebnisse nicht erfüllt sind. Bei den geprüften EWZ ließ sich keine Zeitabhängigkeit beobachten. Die zwischen den EWZ beobachteten Differenzen der RF sind nicht signifikant und können als Messvariabilität interpretiert werden.

5.1.2.2 Si2 (mesoporöse SiNPs + PBS (1:1) autoklaviert), 4,0 mg/ml

Si2 war bei einer Wirkstoffkonzentration von 4,0 mg/ml höher konzentriert, stellte sich jedoch mit einem ähnlichen Bild wie Si1 dar. Die mittleren RF bewegen sich in einem Bereich zwischen $0,75 \pm 0,58$ nach 30 und $0,92 \pm 0,59 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ nach 60 min und weichen damit deutlich vom Wert Null ab (siehe Abb. 11, S. 52). Diese Abweichung ist für alle EWZ signifikant (siehe Tab. 19, S. 71), sodass für Si2 ebenfalls eine geringfügige virusinaktivierende Wirkung konstatiert werden kann. Der RF blieb über alle vier EWZ ohne signifikante Unterschiede konstant.

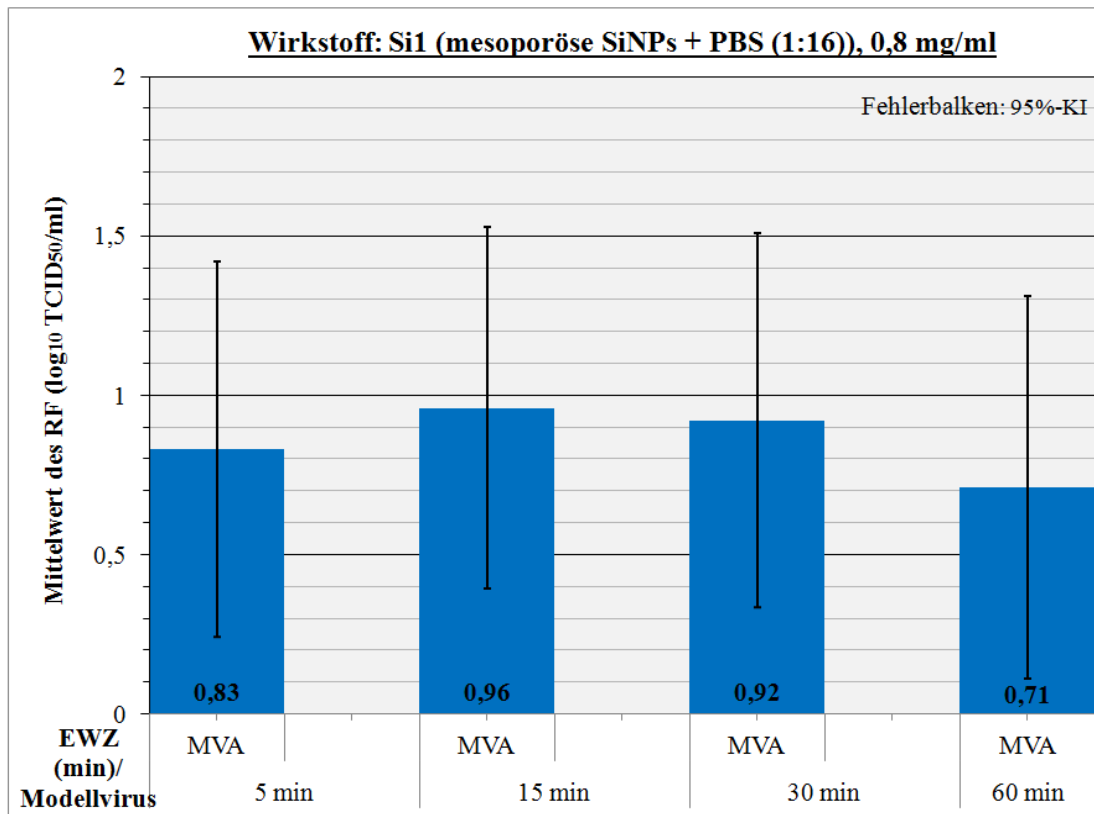


Abb. 10: Darstellung der ermittelten RF für Si1 gegenüber MVA in Abhängigkeit der EWZ. Angabe der RF als Mittelwerte einer Stichprobe.

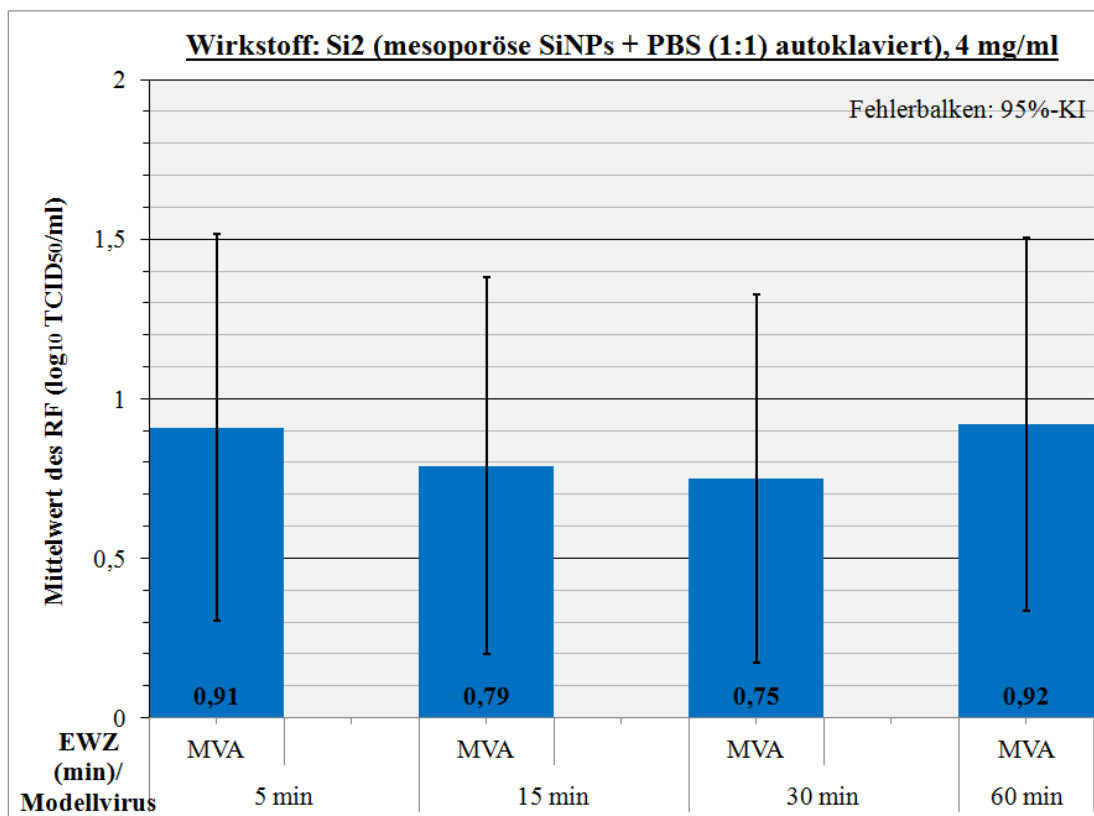


Abb. 11: Darstellung der ermittelten RF für Si2 gegenüber MVA in Abhängigkeit der EWZ. Angabe der RF als Mittelwerte einer Stichprobe.

5.1.2.3 Si3 (SiNWs + PBS (1:1)), 0,32 mg/ml

Si3 kam bei einer Wirkkonzentration von 0,32 mg/ml zur Anwendung und zeigte dabei keinen virusreduzierenden Effekt. Die mittleren RF sind deutlich kleiner als ihre zugehörigen 95 %-KI (siehe Abb. 12, S. 54) und liegen damit innerhalb der natürlichen Variabilität einer biologischen Messung. Auch der bei einer EWZ von 5 min im negativen Bereich bestimmte RF ist Ausdruck der Variabilität und bedeutet nicht, dass der Virustiter im Reaktionsansatz zunimmt.

5.1.2.4 Si4 (SiNWs + PBS (1:1) autoklaviert), 0,32 mg/ml

Si4 ist identisch mit Si3, mit der Ausnahme, dass Si4 autoklaviert wurde. Letztendlich spielte dies jedoch keine Rolle, da in keiner der Proben eine Verunreinigung bakterieller oder mykogener Art festgestellt wurde. Insbesondere in Bezug auf Zusammensetzung und Konzentration stimmen beide Proben überein. Dementsprechend unterscheiden sich auch die Ergebnisse nicht wesentlich voneinander (siehe Abb. 12 und 13, S. 54). Für Si4 weichen die RF nicht signifikant von der Null ab (siehe Tab. 19, S. 71) bzw. liegen im negativen Bereich. Damit ist für Si4, wie bei Si3, keine virusreduzierende Wirkung nachweisbar.

5.1.2.5 Wirkstoffvergleich - Silizium-Nanostrukturen

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich jeweils zwei Proben in Bezug auf die beobachteten bzw. nicht beobachteten Effekte ähnlich verhalten. Die für Si1 und Si2 einerseits sowie für Si3 und Si4 andererseits ermittelten RF ergaben bei paarweisen Vergleichen signifikante Unterschiede (jeweils $p < 0,001$). Demgegenüber unterscheiden sich die praktisch identischen und im quantitativen Suspensionsversuch wirkungslosen Proben Si3 und Si4 nicht. Genauso verhält es sich bei Si1 und Si2, wo die beobachtete Wirkungsähnlichkeit ebenfalls mit den Substanzkenntnissen übereinstimmt. Unterschiede finden sich bei diesen Proben nur in ihrer Konzentration, während Herstellungsmethode und Morphologie gleich sind. Si1 und Si2 zeigten in einem Bereich zwischen 0,71 und 0,96 \log_{10} TCID₅₀/ml einen geringfügigen virusreduzierenden Effekt, welcher signifikant größer Null ist. Angesichts einer Streubreite von zusammenfassend $\leq 0,64 \log_{10}$ TCID₅₀/ml (siehe Tab. 19, S. 71) bei gleichzeitig derart niedrigen RF ist der statistische Aussagewert dieser Ergebnisse jedoch trotzdem extrem limitiert. Aufgrund der geringen Wirkung bei einer ebenfalls geringen Zytotoxizität (2,50 \log_{10} TCID₅₀/ml für Si1/3/4 sowie 3,50 \log_{10} TCID₅₀/ml für Si2) konnten die RF uneingeschränkt ermittelt werden.

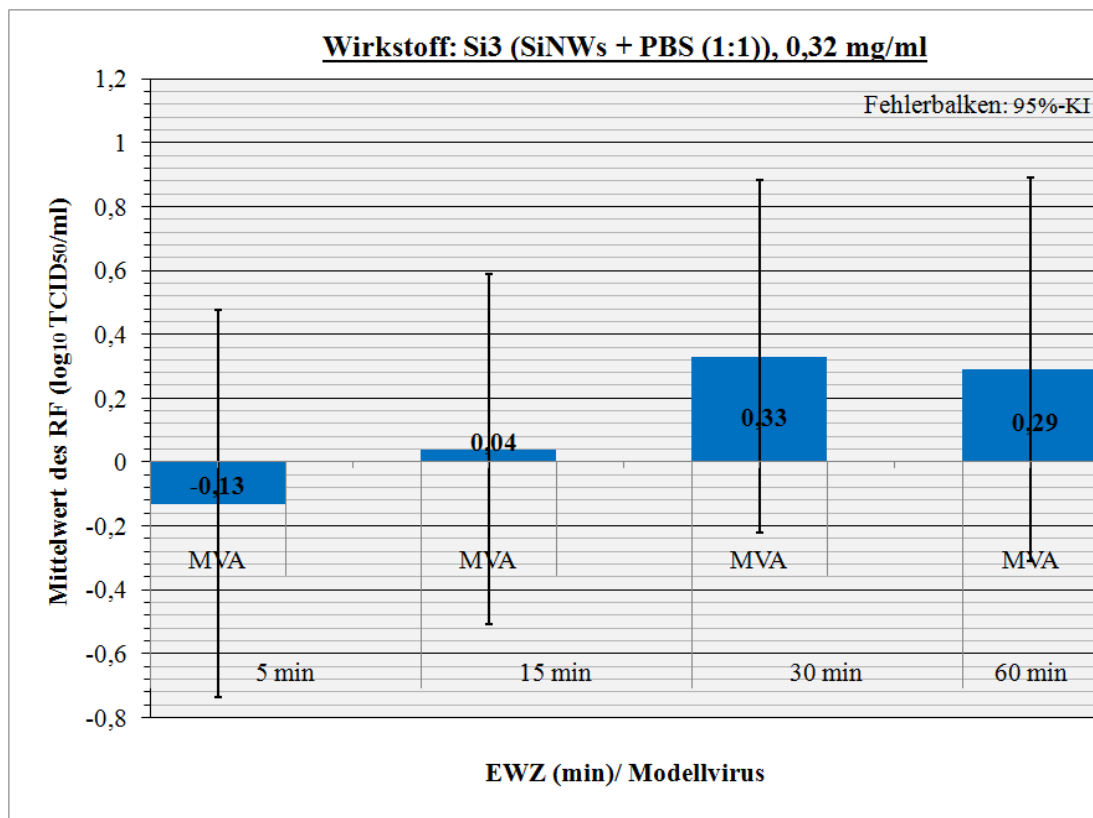


Abb. 12: Darstellung der ermittelten RF für Si3 gegenüber MVA in Abhängigkeit der EWZ. Angabe der RF als Mittelwerte einer Stichprobe.

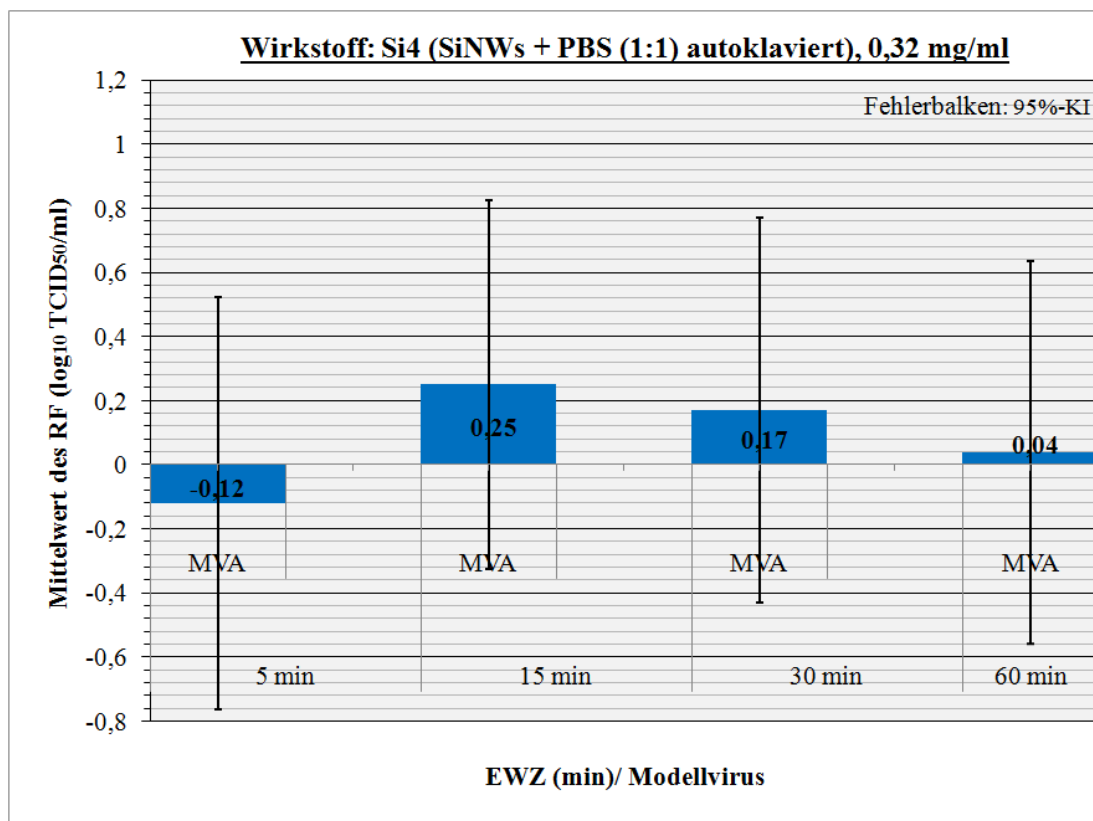


Abb. 13: Darstellung der ermittelten RF für Si4 gegenüber MVA in Abhängigkeit der EWZ. Angabe der RF als Mittelwerte einer Stichprobe.

5.1.3 Wolframcarbid-Nanostrukturen (IKTS, Hermsdorf)

Bei der Aufnahme der WC-Partikel in WSH bildeten sich tiefschwarze Suspensionen, in denen die Partikel nur unter ständiger Durchmischung fein verteilt vorlagen. In Ruhe sank ein Großteil der leicht agglomerierenden Partikel binnen weniger Sekunden zu Boden, sodass feste und flüssige Bestandteile rasch voneinander separiert waren. Insgesamt bedingen diese Eigenschaften ein schlechtes Pipettierverhalten. Zur Vermeidung größerer Schwankungen der Wirkstoffkonzentration mussten die Suspensionen gründlich durchmischt und zügig pipettiert werden. Im Rahmen der Suspension wurde bei WC1, WC2, WC4 und WC5 eine Ansäuerung des pH-neutralen WSH beobachtet. Dabei sank der pH-Wert in wiederholten Messungen auf 3,04 bei WC1, 3,15 bei WC2, 3,13 bei WC4 und 6,04 bei WC5. Demgegenüber verursachte WC3 keine Veränderungen des pH-Werts. Der erniedrigte pH-Wert stellte sich auch bei Verdünnung der Proben in Zellkulturmedium an einem Farbumschlag desselben dar.

Summa summarum wurde für fünf verschiedene Proben bei 5, 15, 30 und 60 min der RF bestimmt. Außer den in Tab. 11 (S. 35) zusammengefassten Eigenschaften ist über die einzelnen Proben und damit auch über die Unterschiede zwischen den Proben wenig bekannt. Wahrscheinlich handelt es sich um minimale Variationen der Produktionsbedingungen, zu denen keine näheren Informationen vorliegen. Das bereits in Ruhe beobachtete Absinken der Partikel wurde im Rahmen der Versuchsdurchführung durch Zentrifugation verstärkt und beschleunigt, sodass eine komfortable Trennung von Überstand und Sediment möglich war.

Zur Identifizierung Modellvirus-spezifischer Unterschiede im statistischen Test wurden für alle Vergleiche mit Beteiligung von MVA lediglich die Mittelwerte der EWZ 5 und 15 min zusammengefasst, da der RF bei Messungen im Zusammenhang mit MVA zu höheren EWZ nicht vollständig darstellbar war. Diese Anmerkung gilt für alle sich anschließenden Modellvirusvergleiche von WC1 bis WC4.

5.1.3.1 WC1 = WC 3530 Riga, 100 mg/ml

- MVA

WC1 konnte MVA ab einer EWZ von 15 min ausreichend und zuverlässig reduzieren. Nach 5 min nahm der mittlere RF bereits Werte in Höhe von $3,82 \pm 0,55 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ an, womit die Wirksamkeitsgrenze knapp unterschritten wurde. Eine deutliche und gegenüber dem Grenzwert $4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ signifikant höhere Virusreduktion wurde bei einem mittleren RF von $5,07 \pm 0,47 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ erstmalig nach 15 min festgestellt. Danach verlangsamte sich der Anstieg des RF, sodass Werte bei $5,25 \pm 0,37$ und schließlich $\geq 5,32 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ für 30 bzw. 60 min erhoben wurden. Die Daten zeigen einen zeitabhängigen Anstieg des RF,

wobei dieser innerhalb der ersten 5 min am größten ist und sich danach langsam einem Grenzwert annähert (siehe Abb. 15, S. 57). Ab einer EWZ von 60 min galt für den RF „≥“, da größere Werte wegen Limitationen primär durch Zytotoxizität und sekundär durch zu geringe AVT nicht mehr darstellbar waren.

Zur Illustration sind in Abb. 14 lichtmikroskopische Aufnahmen nicht-infizierter und mit MVA infizierter BHK-21-Zellkulturen dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die infizierten Zellen gegenüber denjenigen der ZK abgerundet erscheinen. Die ursprünglich spindelförmigen Zellkörper der Fibroblasten nehmen eine kugelige Gestalt an. Zusätzlich können Kernveränderungen erkannt werden, welche auf Apoptose hinweisen (siehe Abb. 14).

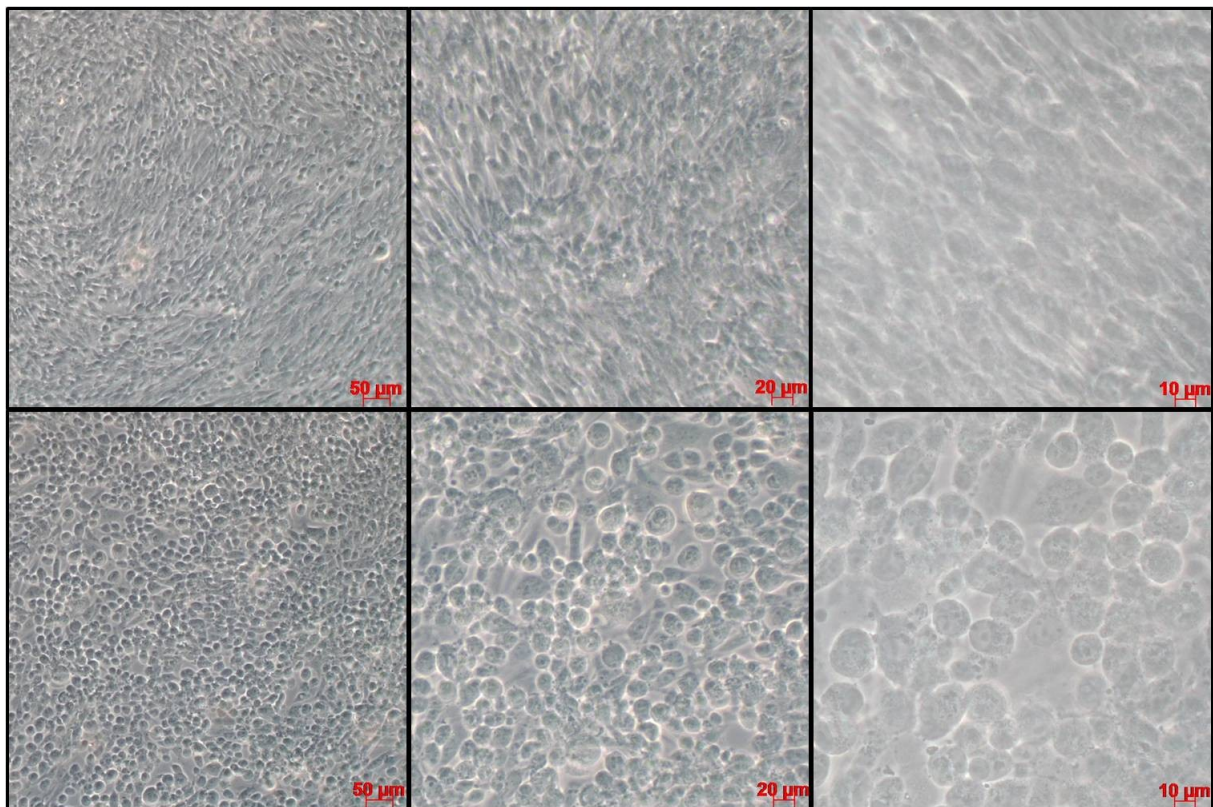


Abb. 14: zpE in BHK-21-Zellkulturen infiziert mit MVA. ZK in einem Alter von 2 Tagen (obere Reihe) und mit einer MOI von 0,1 infizierte Zellkulturen am 2. Tag p.i. (untere Reihe) bei 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung (von links nach rechts).

- HAdV-5

Gegenüber HAdV-5 zeigte WC1 nach initial relativ geringer Wirkung ab 15 min eine gute und statistisch gesicherte Wirksamkeit. In Zahlen ausgedrückt bedeutet dies mittlere RF von $2,31 \pm 0,58$ nach 5, $4,44 \pm 0,55$ nach 15 und $5,50 \pm 0,52$ bzw. $6,35 \pm 0,47$ \log_{10} TCID₅₀/ml nach 30 und 60 min. Ähnlich wie bei MVA kann ein zeitabhängiger Anstieg des RF festgestellt werden, der im Vergleich jedoch verzögert erscheint.

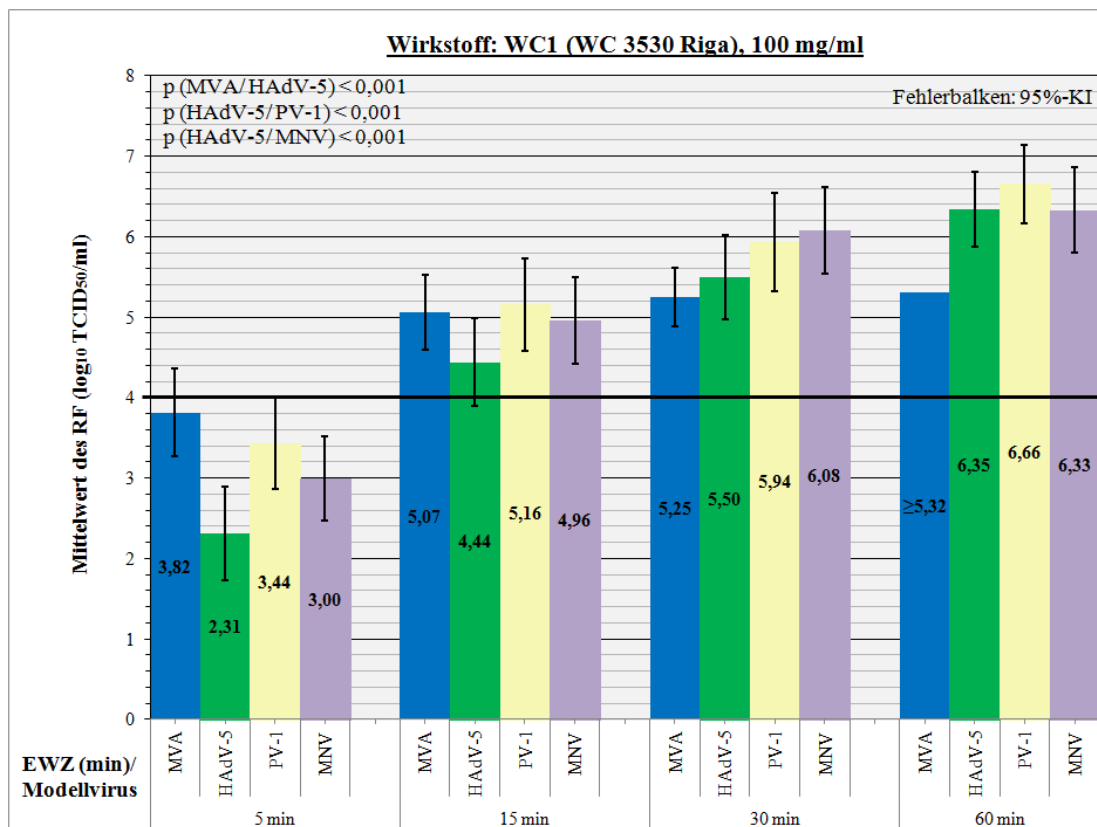


Abb. 15: Darstellung der ermittelten RF für WC1 in Abhängigkeit von EWZ und Modellvirus.
Angabe der RF als Mittelwerte einer Stichprobe.

- PV-1

Für PV-1 zeigte WC1 nach 15 min eine statistisch gesicherte Wirksamkeit. Der RF stieg kontinuierlich an, beginnend bei $3,44 \pm 0,57$ nach 5, über $5,16 \pm 0,57$ und $5,94 \pm 0,61$ nach 15 bzw. 30 und endete bei $6,66 \pm 0,49 \log_{10}$ TCID₅₀/ml nach 60 min. In diesem Fall bildeten sich die zeitabhängigen Differenzen des RF besonders deutlich ab, da selbst nach 60 min eine fast uneingeschränkte Messung des RF möglich war.

- MNV

Die Testung gegen MNV ergab eine zuverlässige Wirksamkeit von WC1 ab 15 min. Nach 5 min betrug der RF im Mittel $3,00 \pm 0,53 \log_{10}$ TCID₅₀/ml, womit eine ausreichende Wirkung noch nicht gegeben war. Im weiteren Verlauf war ein kontinuierlicher Anstieg des RF zu sehen, der nach 15 und 30 min Mittelwerte von $4,96 \pm 0,54$ und $6,08 \pm 0,53 \log_{10}$ TCID₅₀/ml annahm und sein Maximum in Form von $6,33 \pm 0,49 \log_{10}$ TCID₅₀/ml nach 60 min erreichte. Zwischen 30 und 60 min, wo die Wirkung entsprechend ihrer Kinetik ein Plateau erreicht, stellten sich die zeitabhängigen Differenzen nur noch subtil dar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich WC1 bezüglich seiner virusreduzierenden Wirkung und der Kinetik dieser Wirkung gegenüber allen getesteten Modellviren ähnlich

verhält. Statistisch gesicherte Unterschiede bezüglich der RF bei verschiedenen Modellviren wurden vereinzelt beobachtet, waren jedoch betragsmäßig gering. Signifikant unterschiedliche RF fanden sich beispielsweise beim Vergleich von MVA, PV-1 und MNV einerseits gegenüber HAdV-5 andererseits (jeweils $p < 0,001$), wobei HAdV-5 jeweils schlechter inaktiviert wurde. Bei differenzierter Betrachtung scheint bei höheren EWZ eine Egalisierung dieses Unterschieds einzutreten. Demzufolge muss bei WC1 unter Berücksichtigung einer geringfügig schlechteren Wirkung gegen HAdV-5, die v.a. bei kurzen EWZ gilt, von einem unspezifischen Wirkmechanismus ausgegangen werden. Die Wirkung ging bei allen Modellviren von MVA bis MNV ab einer EWZ von 15 min in signifikante Wirksamkeit über (siehe Tab. 19, S. 71). Demgegenüber sind 5 min zu kurz, um eine ausreichende Virusreduktion zu erreichen. Die Zeitabhängigkeit der Wirkung präsentiert für alle Modellviren ein einheitliches Muster. Dabei fand der größte Anteil der Virusreduktion innerhalb der ersten 5 min statt, während danach nur noch kleinere Veränderungen beobachtet wurden. Durch Verbindung der einzelnen Messpunkte entsteht eine Kurve mit asymptotischem Verlauf. Mittels Varianzanalyse ist die EWZ als signifikanter Einflussfaktor ($p < 0,001$) auch statistisch abgesichert und bestätigt.

5.1.3.2 WC2 = WC Riga 6, 100 mg/ml

- MVA

Für WC2 kann festgestellt werden, dass gegenüber MVA bereits nach 5 min eine Virusreduktion um im Mittel $4,88 \pm 0,51 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ erreicht war. Dies entspricht einer sehr guten und v.a. schnellen Wirksamkeit, die jedoch nur bei isolierter Betrachtung von Mittelwert und 95 %-KI gilt. Statistische Signifikanz i.S.e. Abweichung vom Grenzwert $4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ kann dagegen nicht festgestellt werden. Ungeachtet dessen setzte sich die Virusreduktion zügig fort, wobei eine Weiterverfolgung aufgrund methodischer Limitationen nicht lange möglich war. Bereits nach 15 min waren die Grenzen der Messung erreicht und RF konnten nur noch bis zu einem Wert von $5,32 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ gemessen werden. Auch für die EWZ 30 und 60 min galt für den RF jeweils $\geq 5,32 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Die Zeitabhängigkeit ist erkennbar, war jedoch aufgrund der früh eingeschränkten Messung nur mäßig darstellbar.

- HAdV-5

Die Virusmenge von HAdV-5 wurde durch WC2 effektiv reduziert. Nach 5 min betrug der RF im Mittel $4,00 \pm 0,60 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ und lag damit exakt auf der Wirksamkeitsgrenze. Aufgrund seines 95 %-KI, welches auch Werte < 4 einschließt, ist dieses Ergebnis jedoch

nicht statistisch sicher i.S.e. definitionsgerechten Wirksamkeit. Demgegenüber kann nach 15, 30 und 60 min bei mittleren RF in Höhe von $4,71 \pm 0,58$, $5,54 \pm 0,53$ und $6,08 \pm 0,56 \log_{10}$ TCID₅₀/ml von einer sicheren Wirksamkeit ausgegangen werden. Die Zeitabhängigkeit und der kontinuierliche Anstieg des RF bis hin zur asymptotischen Annäherung an seinen Grenzwert sind gut erkennbar.

Zum besseren Verständnis der zpE-Erfassung sind in Abb. 16 lichtmikroskopische Aufnahmen nicht-infizierter und mit HAdV-5 infizierter A-549-Zellkulturen dargestellt. Während die Zellrasen der nicht infizierten ZK geschlossen sind, weisen diejenigen der infizierten Zellkulturen große Lücken auf (siehe Abb. 16). Diese sind durch den Verlust von Interzellularkontakten bedingt.

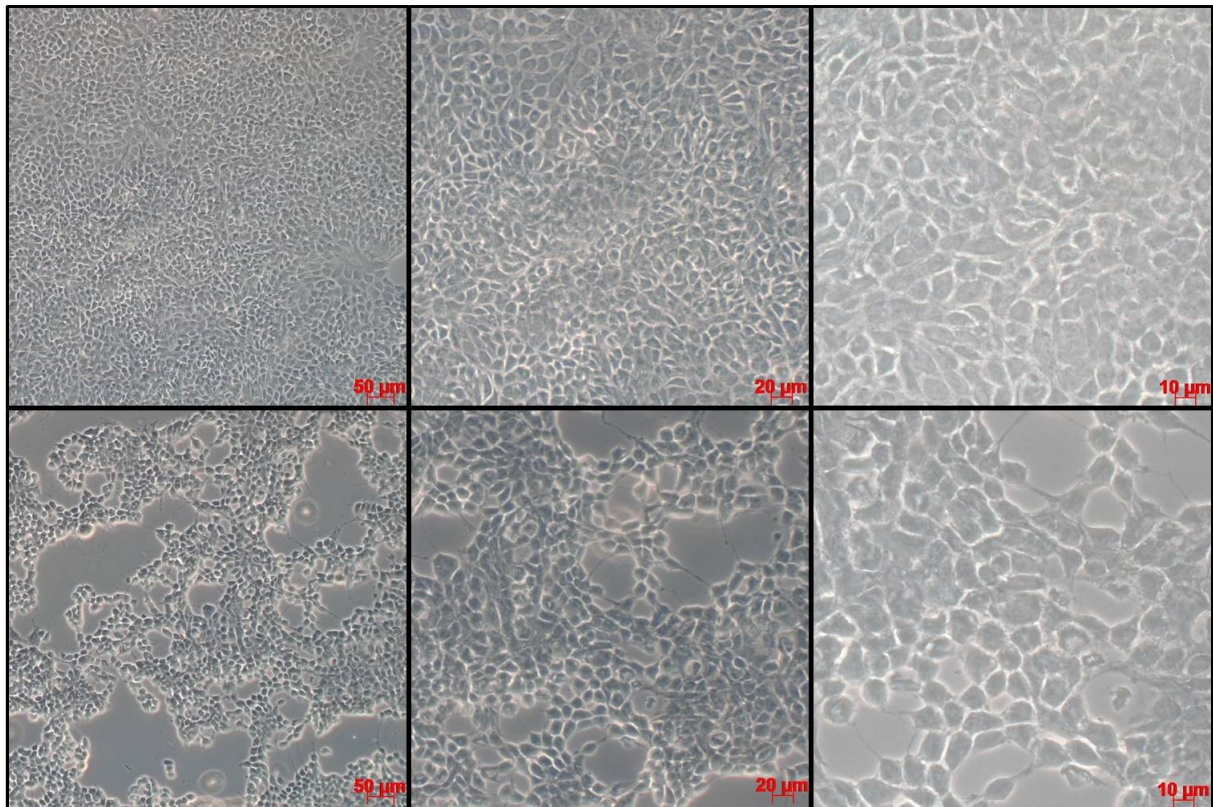


Abb. 16: zpE in A-549-Zellkulturen infiziert mit HAdV-5. ZK in einem Alter von 5 Tagen (obere Reihe) und mit einer MOI von 0,1 infizierte Zellkulturen am 4. Tag p.i. (untere Reihe) bei 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung (von links nach rechts).

- PV-1

Eine fünfminütige Inkubation von PV-1 mit WC2 führte zu einer deutlichen Virusreduktion um im Mittel $4,33 \pm 0,56 \log_{10}$ TCID₅₀/ml, entspricht jedoch unter Berücksichtigung des 95 %-KI nicht den Wirksamkeitsanforderungen. Der RF stieg danach auf $4,79 \pm 0,59$ nach 15, $5,54 \pm 0,57$ nach 30 und schließlich $6,29 \pm 0,59 \log_{10}$ TCID₅₀/ml nach 60 min. Damit ist nach

15 min eine statistisch signifikante Wirksamkeit i.S.e. $RF > 4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ gegenüber PV-1 belegt. Des Weiteren folgt die Virusreduktion der bekannten Kinetik, die durch einen initial starken Anstieg mit anschließender Abflachung der Reduktionskurve charakterisiert ist.

- MNV

Am deutlichsten scheint die Wirksamkeit gegen MNV zu sein, wo nach nur fünfminütiger Inkubation eine statistisch signifikante Wirksamkeit ($p = 0,007$) in Form einer Virusreduktion um $5,62 \pm 0,65 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ erreicht wurde. Nach 15 min betrug der RF $6,17 \pm 0,50 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, während er nach 30 und 60 min bei fehlendem Restvirusnachweis in allen Einzelversuchen sein Maximum bei $\geq 6,46 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ erreichte.

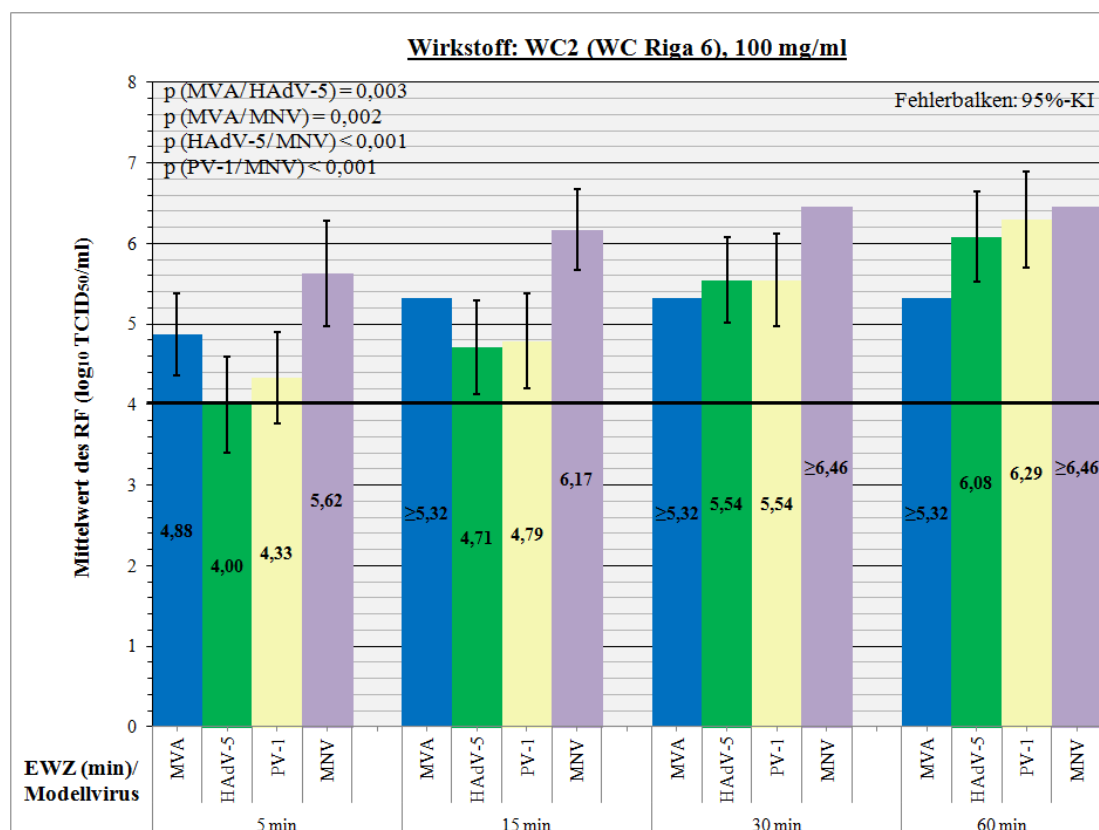


Abb. 17: Darstellung der ermittelten RF für WC2 in Abhängigkeit von EWZ und Modellvirus.
Angabe der RF als Mittelwerte einer Stichprobe.

In der Zusammenfassung lassen sich für den Wirkstoff WC2 klare Tendenzen formulieren, die die Wirkungsweise beschreiben. WC2 scheint gegenüber jedem Modellvirus gleich stark wirksam zu sein. Lediglich MVA und MNV lassen eine im Vergleich mit den anderen Viren höhere Sensitivität vermuten, welche sich insbesondere bei MNV in stärkerer Ausprägung darstellt. So zeigen signifikante Unterschiede, dass MNV im Vergleich mit MVA, HAdV-5 und PV-1 besser inaktiviert wird ($p = 0,002$; $< 0,001$; $< 0,001$). Zwischen MVA und HAdV-5

ergibt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p = 0,003$) bei besserer Inaktivierung von MVA. Zur Wirksamkeit kann konstatiert werden, dass alle Viren bei reiner Betrachtung der Mittelwerte bereits nach 5 min ausreichend reduziert wurden (siehe Abb. 17, S 60). Unter Berücksichtigung der jeweiligen 95 %-KI gilt dies jedoch nur für MVA und MNV, während für HAdV-5 und PV-1 die Einhaltung einer EWZ von mindestens 15 min zur sicheren Inaktivierung erforderlich ist. Neben der überzeugenden Wirksamkeit zeigt sich eine der Virusreduktion zugrundeliegende Zeitabhängigkeit, die entsprechend der Varianzanalyse als statistisch bestätigt gilt ($p < 0,001$).

5.1.3.3 WC3 = Aviro-OC-01/13, 100 mg/ml

- MVA

Für WC3 wurde eine vergleichsweise langsame Virusreduktion in der Testung gegenüber MVA beobachtet. In Mittelwerten angegeben, erzielte WC3 RF in Höhe von $2,80 \pm 0,53$, $3,63 \pm 0,47$, $\geq 3,97$ und $\geq 3,96 \log_{10}$ TCID₅₀/ml nach 5, 15, 30 bzw. 60 min. Auf der Basis dieser Daten liegt zu keiner der EWZ Wirksamkeit vor. Es muss jedoch bedacht werden, dass eine starke Zytotoxizität in Höhe von $\leq 4,50 \log_{10}$ TCID₅₀/ml sowie relativ zu geringe AVT der Messung limitierend gegenüberstanden. Insbesondere nach 30 und 60 min kann über eine das darstellbare Maß überschreitende Wirksamkeit spekuliert werden. Die Zeitabhängigkeit war aufgrund der früh einsetzenden Einschränkungen nur anfänglich darstellbar.

- HAdV-5

Gegen HAdV-5 zeigte WC3 bereits nach 5 min bei einem RF von $4,23 \pm 0,54 \log_{10}$ TCID₅₀/ml Wirksamkeit, die jedoch bei Berücksichtigung von 95 %-KI und T-Test nicht signifikant ist. Für alle weiteren EWZ, bei denen RF von $5,53 \pm 0,46$ nach 15 bzw. $\geq 5,58 \log_{10}$ TCID₅₀/ml nach 30 und 60 min gemessen wurden, kann dagegen Signifikanz i.S.v. Wirksamkeit gefunden werden (siehe Fortsetzung Tab. 19, S. 72). Wieder stellte eine starke Zytotoxizität von $\leq 4,50 \log_{10}$ TCID₅₀/ml den limitierenden Faktor dar, der die Messung noch höherer RF nach 30 und 60 min verhinderte. Die Zeitabhängigkeit der Wirkung ist damit nur zwischen den kurzen EWZ 5 und 15 min beurteilbar und an diesen Stellen auch erkennbar.

- PV-1

Die Inkubation von PV-1 mit WC3 führte zu mittleren RF in Höhe von $0,91 \pm 0,56$, $1,54 \pm 0,52$, $2,62 \pm 0,50$ und $3,87 \pm 0,57 \log_{10}$ TCID₅₀/ml nach 5, 15, 30 bzw. 60 min. Angesichts dieser Daten wird das PV-1 seiner Rolle eines resistenten Modellvirus gerecht. Nach 60 min verfehlte der mittlere RF nur knapp die Wirksamkeitsgrenze und kann laut 95 %-KI auch

Werte $> 4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ annehmen. Eine gelegentliche Wirksamkeit erfüllt jedoch nicht die an DM gestellte Anforderung der konstanten Wirksamkeit. Aufgrund der geringen Wirkung war die Messung des RF zu allen EWZ uneingeschränkt möglich. Damit verbunden ließ sich die zeitabhängige Zunahme des RF gut darstellen.

Abb. 18 stellt die Charakteristik des durch PV-1 auf BGM verursachten zpE dar. In den infizierten Zellkulturen verlieren die Zellen ihre Adhärenz zum Untergrund, sodass große Lücken im Zellrasen entstehen. Bei fast vollständiger Zytolyse und starker Reduktion der Zelldichte liegen die Zellen vereinzelt vor. In den noch adhären Zellen ist eine Vakuolisierung des Zytoplasmas erkennbar (siehe Abb. 18).

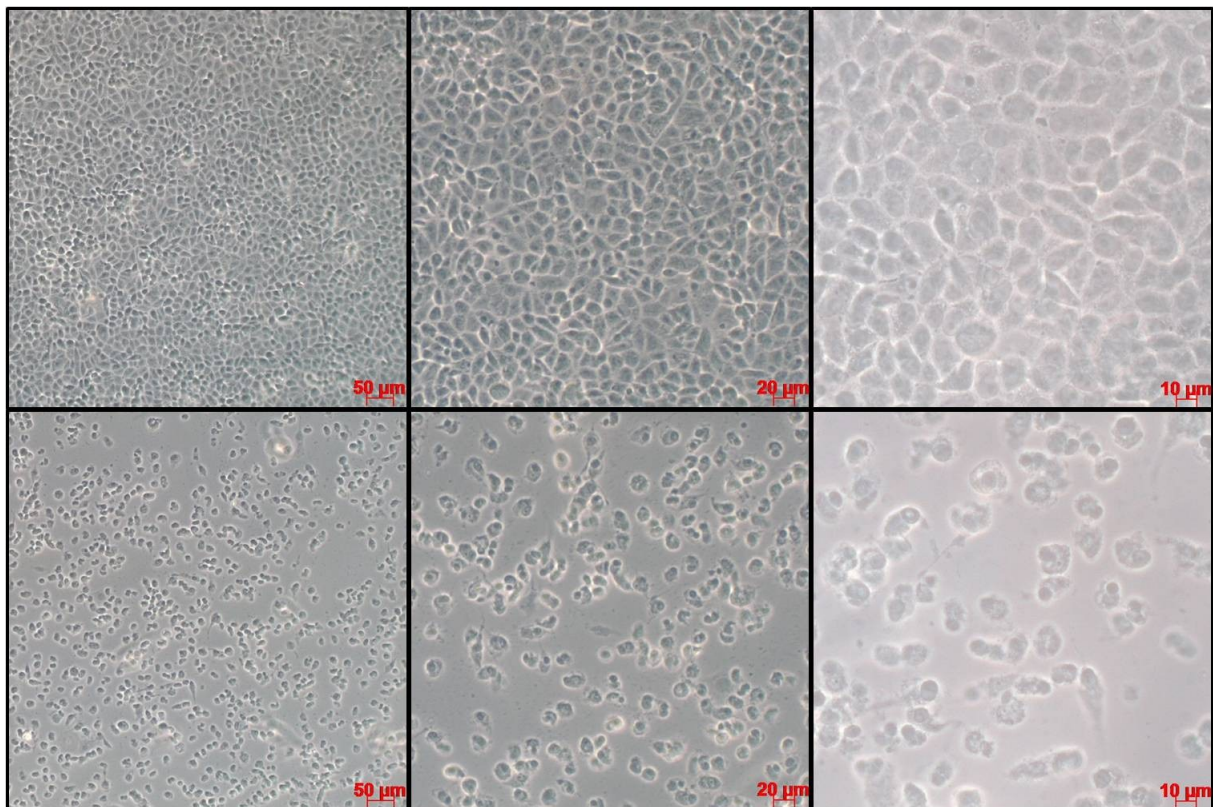


Abb. 18: zpE in BGM-Zellkulturen infiziert mit PV-1. ZK in einem Alter von 2 Tagen (obere Reihe) und mit einer MOI von 0,1 infizierte Zellkulturen am 1. Tag p.i. (untere Reihe) bei 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung (von links nach rechts).

- MNV

Der MNV-AVT wurde durch die Inkubation mit WC3 um $5,00 \pm 0,53$, $5,62 \pm 0,49$, $6,25 \pm 0,51$ und $6,42 \pm 0,48 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ nach 5, 15, 30 bzw. 60 min reduziert. Alle RF sind signifikant $> 4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (siehe Fortsetzung Tab. 19, S. 72), sodass sich eine überzeugende Wirksamkeit ergibt. Die Messung des RF war zu keiner EWZ limitierenden Faktoren ausgesetzt.

Schlussendlich zeigt WC3 ein höchst unterschiedliches Wirkungsverhalten bei verschiedenen Viren und damit ein heterogenes Wirkspektrum (siehe Abb. 19). Alle zwischen den Modellviren beobachteten Unterschiede sind auf einem Niveau von $p < 0,001$ signifikant. Während gegen MNV erstaunlich hohe RF erzielt wurden, konnte keine Wirksamkeit bei PV-1 gezeigt werden. HAdV-5 wurde überzeugend und MVA bei eingeschränkter Beurteilbarkeit mäßig reduziert. Letztere lassen sich somit im Mittelfeld einordnen, wohingegen PV-1 resistent und MNV besonders sensitiv erscheint. Im Fall der sensitiven Modellviren MNV und HAdV-5 wurde signifikante Wirksamkeit nach 5 bzw. 15 min erreicht. Die zeitabhängige Inaktivierung ist mehrheitlich erkennbar und statistisch signifikant ($p < 0,001$).

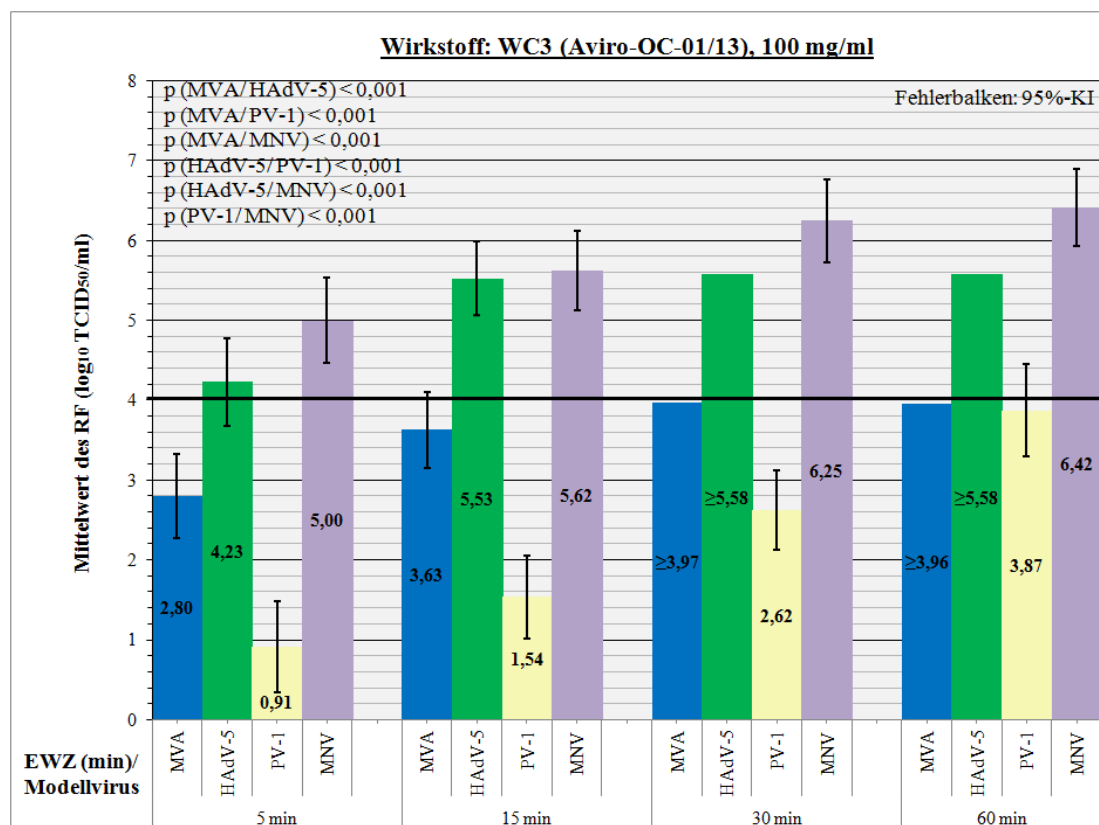


Abb. 19: Darstellung der ermittelten RF für WC3 in Abhängigkeit von EWZ und Modellvirus.
Angabe der RF als Mittelwerte einer Stichprobe.

5.1.3.4 WC4 = 2013-02 J/G/R, 100 mg/ml

- MVA

Der MVA-Virustiter wurde durch Inkubation mit WC4 nach 5 min um durchschnittlich $4,38 \pm 0,56 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ reduziert. Der T-Test bestätigt diesen RF als signifikant $> 4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ($p = 0,036$), obwohl das 95 %-KI die Wirksamkeitsgrenze überschneidet. Nach 15 und 30 min war die Wirksamkeit noch deutlicher und drückte sich in einem RF von

jeweils $5,08 \pm 0,43 \log_{10}$ TCID₅₀/ml aus. Bei fehlendem Nachweis von Restvirus nahm der RF nach 60 min schließlich einen Wert von $\geq 5,13 \log_{10}$ TCID₅₀/ml an. Trotz früh einsetzender messtechnischer Einschränkungen kann eine zeitabhängige Wirkung vermutet werden, die sich v.a. in unterschiedlichen RF zwischen 5 und 15 min ausdrückt.

- HAdV-5

Für HAdV-5 ergab sich nach 5 min ein mittlerer RF in Höhe von $3,96 \pm 0,61 \log_{10}$ TCID₅₀/ml und damit keine ausreichende Reduktion. Nach 15 min lag der RF mit einem Mittelwert von $5,21 \pm 0,61 \log_{10}$ TCID₅₀/ml weit über der Wirksamkeitsgrenze und stieg auch nach 30 und 60 min auf $6,33 \pm 0,56$ bzw. $6,50 \pm 0,50 \log_{10}$ TCID₅₀/ml weiter an. In den Werten wird die zeitabhängige Kinetik deutlich.

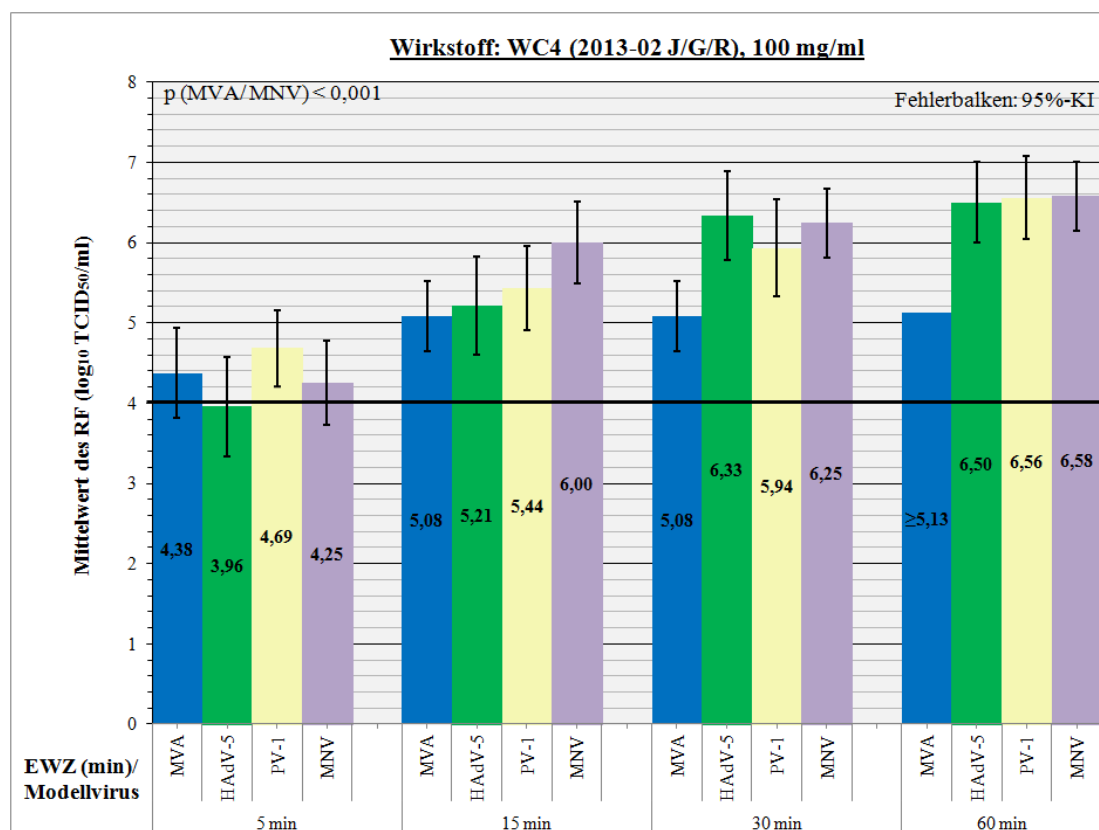


Abb. 20: Darstellung der ermittelten RF für WC4 in Abhängigkeit von EWZ und Modellvirus.
Angabe der RF als Mittelwerte einer Stichprobe.

- PV-1

Gegenüber PV-1 wurden für WC4 wirksame RF gemessen, wobei schon nach 5 min eine Reduktion um $4,69 \pm 0,47 \log_{10}$ TCID₅₀/ml erreicht wurde. Lediglich Signifikanz i.S.e. Reduktion $> 4 \log_{10}$ TCID₅₀/ml konnte nach 5 min nicht festgestellt werden und bedarf höherer Werte, die sich im weiteren Verlauf nach 15, 30 und 60 min in Form von $5,44 \pm 0,53$, $5,94 \pm 0,60$ bzw. $6,56 \pm 0,52 \log_{10}$ TCID₅₀/ml fanden. Erneut reflektiert sich in den Daten die

Zeitabhängigkeit der Wirkung. WC4 kann eine starke sowie schnelle Wirksamkeit gegenüber PV-1 bescheinigt werden, die dank einer geringen Zytotoxizität auf BGM-Zellen von $\leq 2,50 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ohne methodische Einschränkungen messbar war.

- MNV

MNV wurde durch WC4 stark reduziert und nahm für den RF nach 5 min einen Wert von $4,25 \pm 0,52 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ an. Da dieser Wert nicht signifikant über dem Grenzwert liegt, konnte eine zuverlässige Wirksamkeit erst nach 15 min in Form einer Reduktion um $6,00 \pm 0,51 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ gezeigt werden. Nach 30 und 60 min lagen die RF im Mittel bei $6,25 \pm 0,43$ bzw. $6,58 \pm 0,43 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Die zeitabhängige Inaktivierung demonstriert eine Abflachung der Reduktionskurve ab 15 min.

In Abb. 21 kann der von MNV auf 264.7 verursachte zpE beurteilt werden. Die infizierten Zellkulturen zeigen im Vergleich zur nicht infizierten ZK eine deutlich geringere Zelldichte. Neben einer Vakuolisierung des Zytoplasmas können vereinzelt doppelkernige Zellen als Ausdruck von zwei miteinander verschmolzenen Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 21).

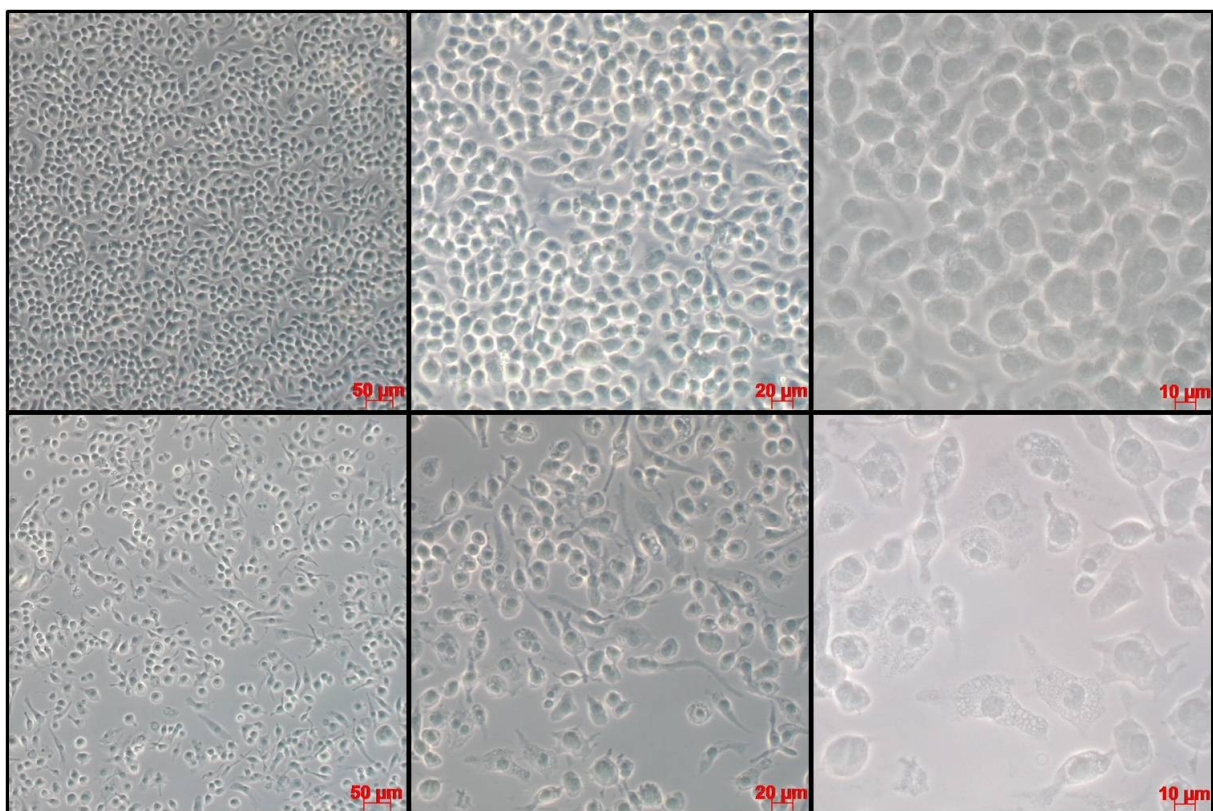


Abb. 21: zpE in RAW 264.7-Zellkulturen infiziert mit MNV. ZK in einem Alter von 2 Tagen (obere Reihe) und mit einer MOI von 0,1 infizierte Zellkulturen am 1. Tag p.i. (untere Reihe) bei 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung (von links nach rechts).

Insgesamt präsentiert WC4 bezüglich der Wirksamkeit gegen verschiedene Viren ein weitgehend homogenes Bild. Ein geringfügiger Unterschied drückt sich in der Beziehung zwischen MVA und MNV aus und zeigt eine signifikant bessere Inaktivierung von MNV ($p < 0,001$). Bei differenzierter Analyse zeigt sich jedoch, dass dieser Unterschied zeitlich nicht konsistent ist und v.a. durch den Vergleich bei einer EWZ von 15 min bedingt ist (siehe Abb. 20, S. 64). Alle übrigen Vergleiche besitzen keine statistische Signifikanz. Bei WC4 setzt eine gesicherte Wirksamkeit mehrheitlich erst nach 15 min ein, wohingegen 5 min nur gegen MVA ausreichen, um eine signifikant wirksame Virusreduktion zu erreichen. Die zeitliche Entwicklung des RF ließ sich gut darstellen und ist lediglich bei MVA eingeschränkt beurteilbar. Die EWZ kann als signifikanter Einflussfaktor ($p < 0,001$) bestätigt werden.

5.1.3.5 WC5 = W₂C/C 08/12, 100 mg/ml

- MVA

WC5 konnte den MVA-Virustiter im Mittel um $1,75 \pm 0,55$, $2,31 \pm 0,56$, $2,63 \pm 0,53$ und $3,19 \pm 0,51 \log_{10}$ TCID₅₀/ml nach 5, 15, 30 bzw. 60 min senken. Darin wird deutlich, dass WC5 durchaus ein virusreduzierendes Potenzial besitzt und dieses zeitabhängig zunimmt. Allerdings reicht es nicht aus, um Wirksamkeit i.S.e. Reduktion um $> 4 \log_{10}$ TCID₅₀/ml festzustellen. Zu keiner der vier EWZ wurde dieses Kriterium erfüllt, sodass MVA als relativ resistent gegenüber WC5 bezeichnet werden kann. Aufgrund der geringen virusreduzierenden Wirkung sowie aufgrund einer niedrigen Zytotoxizität auf BHK-21-Zellen in Höhe von $\leq 2,50 \log_{10}$ TCID₅₀/ml konnten alle RF ohne Einschränkungen gemessen werden.

- HAdV-5

Für WC5 gegen HAdV-5 betrugen die RF im Mittel $1,31 \pm 0,62$, $2,41 \pm 0,61$, $3,03 \pm 0,62$ und $3,85 \pm 0,58 \log_{10}$ TCID₅₀/ml nach 5, 15, 30 bzw. 60 min. Wirksamkeit war damit zu keiner der vier EWZ gegeben, obwohl auch hier ein zeitabhängiger Anstieg des RF zu verzeichnen war. Bei einer EWZ von 60 min wurde die Wirksamkeitsgrenze nur noch knapp unterschritten. Zusammenfassend kann erneut gesagt werden, dass bei vorhandener Wirkung keine Wirksamkeit erzielt wurde. Auf A-549-Zellen lag eine im Vergleich gegenüber den anderen WC-Partikeln niedrige Zytotoxizität von $\leq 2,50 \log_{10}$ TCID₅₀/ml vor, wodurch eine uneingeschränkte Messung des RF möglich war.

- PV-1

Die RF von WC5 gegenüber PV-1 betrugen, angegeben in Mittelwerten, $0,99 \pm 0,55$, $1,13 \pm 0,64$, $1,13 \pm 0,63$ und $1,50 \pm 0,59 \log_{10}$ TCID₅₀/ml nach 5, 15, 30 bzw. 60 min.

Auffällig war dabei besonders eine über alle EWZ hinweg geltende Konstanz. Dies steht im starken Kontrast zu den bisher gemachten Beobachtungen und zeigt eine ausgeprägte Resistenz von PV-1 gegenüber WC5. Eine auf BGM-Zellen geringe Zytotoxizität von $\leq 2,50$ \log_{10} TCID₅₀/ml erlaubte die uneingeschränkte Messung des RF.

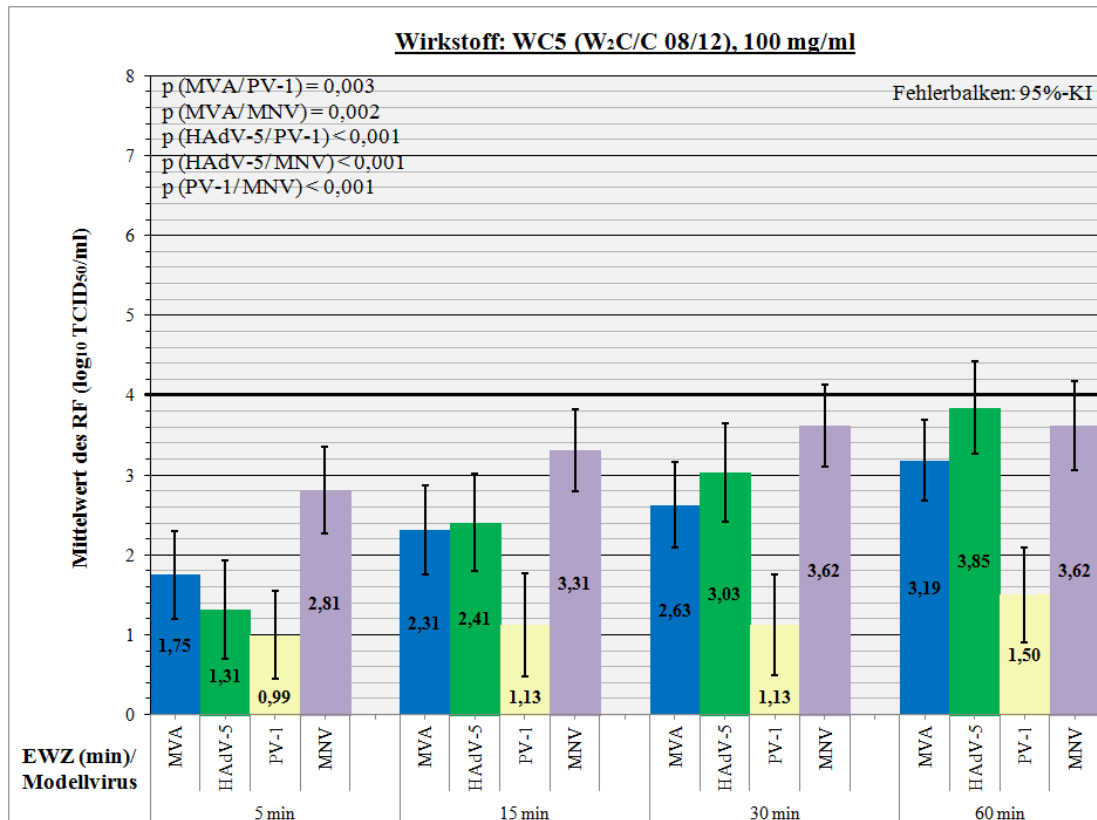


Abb. 22: Darstellung der ermittelten RF für WC5 in Abhängigkeit von EWZ und Modellvirus.
Angabe der RF als Mittelwerte einer Stichprobe.

- MNV

Für MNV wurden mittlere RF in Höhe von $2,81 \pm 0,54$, $3,31 \pm 0,51$, $3,62 \pm 0,51$ und $3,62 \pm 0,56$ \log_{10} TCID₅₀/ml nach 5, 15, 30 bzw. 60 min ermittelt. Die Zeitabhängigkeit der Wirkung ist erkennbar, wobei sich zwischen 30 und 60 min ein Plateau abzeichnet und das Ende der Wirkung markiert. Die Befunde entsprechen erneut einer geringen Wirkung ohne definitionsgerechte Wirksamkeit, die nach 60 min nur unweit von der Wirksamkeitsgrenze entfernt blieb. Bei geringer Zytotoxizität auf RAW-264.7-Zellen in Höhe von $\leq 2,50$ \log_{10} TCID₅₀/ml war die Bestimmung des RF uneingeschränkt möglich.

In der Zusammenfassung kann WC5 als nicht wirksam bezeichnet werden, da die Wirksamkeitsgrenze von 4 \log_{10} TCID₅₀/ml trotz vorhandener virusinaktivierender Wirkung gegenüber keinem Modellvirus und zu keiner EWZ überschritten wurde (siehe Abb. 22). Unterschiede bezüglich der Modellviren waren dennoch vorhanden und zeigen zwischen allen

Modellviren, ausgenommen zwischen MVA und HAdV-5, Signifikanz. Dabei wurde MVA besser inaktiviert als PV-1 ($p < 0,001$), jedoch schlechter als MNV ($p < 0,001$). Identisch verhielt es sich mit HAdV-5 (jeweils $p < 0,001$). Der Vergleich von PV-1 mit MNV zeigt eine signifikant bessere Inaktivierung von MNV ($p < 0,001$). Es ergibt sich eine Reihenfolge, nach der PV-1 die größte Stabilität präsentiert. Gefolgt wird dieses von MVA und HAdV-1, welche gemeinsam das Mittelfeld bilden, während MNV, trotz fehlender Wirksamkeit, die größte Sensitivität präsentiert. Die zeitabhängige Inaktivierung lässt sich für alle Modellviren, ausgenommen PV-1, nachvollziehen und ist statistisch signifikant ($p < 0,001$). Auffallend ist die im Vergleich mit anderen WC-Partikeln geringe Zytotoxizität von WC5, die auf allen Zelllinien $\leq 2,50 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ betrug.

5.1.3.6 Wirkstoffvergleich - Wolframcarbid-Nanostrukturen

Im finalen Vergleich sollen die einzelnen Proben der WC-Nanostrukturen einander gegenübergestellt und auf differente Testergebnisse untersucht werden. Dabei ist es sinnvoll, diese Vergleiche unter Berücksichtigung der verschiedenen Modellviren aufzutrennen. Alle Vergleiche einschließlich signifikanter Unterschiede und ihrer Bedeutung können Tab. 18 entnommen werden. Hervorzuheben ist, dass bei Wirkstoffvergleichen mit Beteiligung von WC3 in den Viruskategorien MVA und HAdV-5 ein Ausschluss der EWZ 30 und 60 min erfolgen musste, da unter diesen Konstellationen der RF nicht vollständig gemessen werden konnte.

Tab. 18: Wirkstoffvergleich zur Identifizierung signifikant unterschiedlicher Wirkstoffbeziehungen. Wirkstoff mit der jeweils höheren Wirksamkeit ist in Klammern angegeben.

Wirkstoffvergleich	Statistische Signifikanz (p-Wert) für unterschiedlich wirksame Wirkstoffe in Abhängigkeit des Modellvirus, n.s. = nicht signifikant			
	MVA, $\alpha \leq 0,001$	HAdV-5, $\alpha \leq 0,003$	PV-1, $\alpha \leq 0,003$	MNV, $\alpha \leq 0,003$
WC1/ WC2	n.s.	<0,001 (WC2)	n.s.	<0,001 (WC2)
WC1/ WC3	<0,001 (WC1)	<0,001 (WC3)	<0,001 (WC1)	<0,001 (WC3)
WC1/ WC4	n.s.	<0,001 (WC4)	n.s.	<0,001 (WC4)
WC1/ WC5	<0,001 (WC1)	<0,001 (WC1)	<0,001 (WC1)	<0,001 (WC1)
WC2/ WC3	<0,001 (WC2)	0,002 (WC3)	<0,001 (WC2)	0,002 (WC2)
WC2/ WC4	n.s.	0,002 (WC4)	n.s.	0,002 (WC2)
WC2/ WC5	<0,001 (WC2)	<0,001 (WC2)	<0,001 (WC2)	<0,001 (WC2)
WC3/ WC4	<0,001 (WC4)	n.s.	<0,001 (WC4)	n.s.
WC3/ WC5	<0,001 (WC3)	<0,001 (WC3)	<0,001 (WC3)	<0,001 (WC3)
WC4/ WC5	<0,001 (WC4)	<0,001 (WC4)	<0,001 (WC4)	<0,001 (WC4)

Aus der Fülle der Vergleiche und den z.T. höchst unterschiedlichen Wirksamkeitsprofilen der verschiedenen Wirkstoffe wird deutlich, dass eine Ableitung von Schlussfolgerungen schwierig ist. Dennoch können aus Tab. 18 (S. 68) einige Aussagen gewonnen werden, auf deren Basis eine Einteilung der Wirkstoffe möglich ist:

1. WC1, WC2 und WC4 besitzen ähnliche Wirksamkeitsprofile, die sich bei MVA und PV-1 nicht unterscheiden. Gegen HAdV-5 und MNV gilt bei geringen Unterschieden bezüglich der Wirksamkeit $WC4 > WC2 > WC1$ bzw. $WC2 > WC4 > WC1$.
2. WC3 unterliegt im Vergleich gegenüber WC1, WC2 und WC4 betreffend der Inaktivierung von MVA und PV-1 deutlich. Gegen HAdV-5 und MNV zeigt sich jedoch eine sogar bessere (WC1) oder gleichwertige (WC4) oder bessere bzw. schlechtere Wirksamkeit (WC2).
3. WC5 unterliegt in allen Vergleichen sowie bei allen Modellviren und gilt damit gegenüber den anderen Wirkstoffen als unwirksam.
4. Bei Fokussierung auf die jeweils beste Wirksamkeit sind WC1, WC2 und WC4 gegenüber MVA und PV-1 zu nennen. Gegenüber HAdV-5 trifft dies auf WC3 und WC4 zu und gegen MNV ist alleine WC2 die Probe mit der größten Wirksamkeit.

5.1.4 Konzentrationsabhängige Kinetik

Durch die Testung verschiedener Konzentrationen des Wirkstoffs sollte gezeigt werden, dass neben der Abhängigkeit der Wirkung von der EWZ auch eine Abhängigkeit von der Konzentration besteht. Dafür wurden vier verschiedene Konzentrationen in Höhe von 10, 50, 80 und 100 mg/ml untersucht. Die Untersuchungen fanden exemplarisch für einen Wirkstoff sowie für eine EWZ und gegenüber einem Modellvirus statt. Aus der Gruppe der WC-Partikel wurde WC4 ausgewählt, da es in den vorangegangenen Versuchen neben WC1 und WC2 die größte Wirksamkeit und das breiteste Wirkspektrum demonstrierte. Außerdem ließen sich die Ergebnisse dieser Probe vergleichsweise gut reproduzieren, womit sie sich ebenfalls für weitere Untersuchungen qualifizierte. Als EWZ wurden 15 min festgelegt, da eine rasche Wirksamkeit in der Praxis wünschenswert ist und dennoch gesicherte Wirksamkeit vorliegen soll. PV-1, mit dem in den Vorversuchen zuverlässige und stabile Ergebnisse erreicht wurden, wurde aufgrund der guten Reproduzierbarkeit ausgewählt. Abb. 23 (S. 70) zeigt die für WC4 gegenüber PV-1 nach 15 min bestimmten Mittelwerte des RF in Abhängigkeit der Wirkstoffkonzentration.

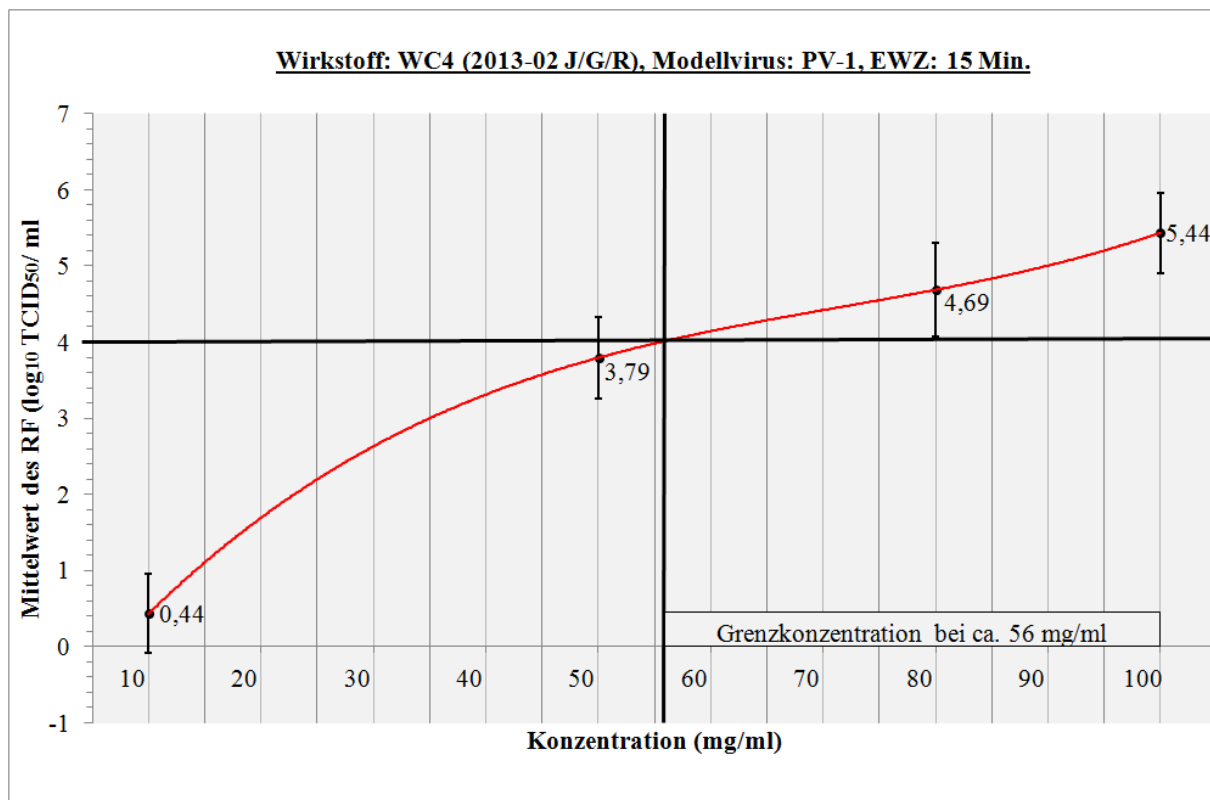


Abb. 23: Darstellung der ermittelten RF für WC4 gegenüber PV-1 nach 15 min in Abhängigkeit der Konzentration. Angabe der RF als Mittelwerte einer Stichprobe.

Aus Abb. 23 ist ersichtlich, dass die Wirkung einer Konzentrationsabhängigkeit unterliegt. Zur statistischen Absicherung wurde eine Varianzanalyse durchgeführt, welche den Einfluss der Konzentration auf den RF bestätigt ($p < 0,001$). Bei einer Konzentration von 10 mg/ml betrug der RF im Mittel $0,44 \pm 0,52 \log_{10}$ TCID₅₀/ml. Damit war fast keine Wirkung nachweisbar. Bei 50 mg/ml verfehlte er bei einem Mittelwert von $3,79 \pm 0,54 \log_{10}$ TCID₅₀/ml knapp die Wirksamkeitsgrenze, wohingegen diese bei 80 mg/ml durch einen mittleren RF von $4,69 \pm 0,61 \log_{10}$ TCID₅₀/ml überschritten wurde. Bei 100 mg/ml betrug der RF im Mittel schließlich $5,44 \pm 0,53 \log_{10}$ TCID₅₀/ml. Durch graphische Interpolation konnte die Grenzkonzentration ermittelt werden, bei der WC4 nach 15 min gegenüber PV-1 gerade noch wirksam ist. Diese liegt im Bereich von etwa 56 mg/ml. Der Kurvenverlauf zeigt einen anfänglich schnellen Anstieg des RF und flacht danach ab. Unregelmäßigkeiten am Ende der Kurve scheinen unbedeutend und sind der geringen Stichprobengröße geschuldet, welche die Daten für Artefakte anfällig macht. Eine exakte Dosis-Wirkungs-Kurve kann aus den vorhandenen Daten demnach nicht erzeugt werden, da dazu mehr Messungen notwendig wären. Für die kurze und einfache Darstellung des Zusammenhangs von Konzentration und Wirkung sind sie jedoch ausreichend und genügen diesem Anspruch.

Tab. 19: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse. Es sind die mittleren RF einschließlich ihrer 95 %-KI für alle Silizium-Nanostrukturen und WC-Partikel in Abhängigkeit von EWZ und Modellvirus abgebildet.

DM	RF (\log_{10} TCID ₅₀ /ml) in Abhängigkeit der EWZ (Min.) einschließlich der statistischen Signifikanz (p-Wert) für RF > 4 (0) bzw. < 4, n.s. = nicht signifikant, $\alpha \leq 0,05$								Zytotoxizität (\log_{10} TCID ₅₀ /ml)	Modellvirus/ Zelllinie
	5		15		30		60			
Si1	0,83 ± 0,59	0,020	0,96 ± 0,57	0,015	0,92 ± 0,59	0,017	0,71 ± 0,60	0,027	≤ 2,50	MVA/ BHK-21
Si2	0,91 ± 0,61	0,018	0,79 ± 0,59	0,022	0,75 ± 0,58	0,023	0,92 ± 0,59	0,017	≤ 3,50	MVA/ BHK-21
Si3	-0,13 ± 0,60	n.s.	0,04 ± 0,55	n.s.	0,33 ± 0,55	n.s.	0,29 ± 0,60	n.s.	≤ 2,50	MVA/ BHK-21
Si4	-0,12 ± 0,64	n.s.	0,25 ± 0,58	n.s.	0,17 ± 0,60	n.s.	0,04 ± 0,60	n.s.	≤ 2,50	MVA/ BHK-21
WC1 WC 3530 Riga	3,82 ± 0,55	n.s.	5,07 ± 0,47	0,050	5,25 ± 0,37	0,034	≥ 5,32 ¹¹	0,027	≤ 3,50	MVA/ BHK-21
	2,31 ± 0,58	0,001	4,44 ± 0,55	0,026	5,50 ± 0,52	0,001	6,35 ± 0,47	<0,001	≤ 3,50	HAdV-5/ A-549
	3,44 ± 0,57	0,015	5,16 ± 0,57	0,002	5,94 ± 0,61	0,001	6,66 ± 0,49	<0,001	≤ 2,50	PV-1/ BGM
	3,00 ± 0,53	0,012	4,96 ± 0,54	0,013	6,08 ± 0,53	0,003	6,33 ± 0,53	0,002	≤ 3,50	MNV/ RAW 264.7
WC2 WC Riga 6	4,88 ± 0,51	n.s.	≥ 5,32	0,027	≥ 5,32	0,027	≥ 5,32	0,027	≤ 3,50	MVA/ BHK-21
	4,00 ± 0,60	n.s.	4,71 ± 0,58	0,026	5,54 ± 0,53	0,005	6,08 ± 0,56	0,003	≤ 3,50	HAdV-5/ A-549
	4,33 ± 0,56	n.s.	4,79 ± 0,59	0,022	5,54 ± 0,57	0,006	6,29 ± 0,59	0,003	≤ 2,50	PV-1/ BGM
	5,62 ± 0,65	0,007	6,17 ± 0,50	0,002	≥ 6,46	0,001	≥ 6,46	0,001	≤ 3,50	MNV/ RAW 264.7

¹¹ Bei RF, für die „≥“ gilt, ist die Streuung nicht verifizierbar und somit das 95 %-KI nicht angegeben.

Fortsetzung auf S. 72

Fortsetzung Tab. 19

DM	RF (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) in Abhängigkeit der EWZ (Min.) einschließlich der statistischen Signifikanz (p-Wert) für RF > 4 bzw. < 4, n.s. = nicht signifikant, $\alpha \leq 0,05$								Zytotoxizität (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	Modellvirus/ Zelllinie
	5		15		30		60			
WC3 Aviro-OC-01/13	2,80 ± 0,53	<0,001	3,63 ± 0,47	0,013	≥ 3,97	n.s.	≥ 3,96	n.s.	≤ 4,50	MVA/ BHK-21
	4,23 ± 0,54	n.s.	5,53 ± 0,46	<0,001	≥ 5,58	<0,001	≥ 5,58	<0,001	≤ 4,50	HAdV-5/ A-549
	0,91 ± 0,56	0,001	1,54 ± 0,52	0,002	2,62 ± 0,50	0,005	3,87 ± 0,57	n.s.	≤ 3,50	PV-1/ BGM
	5,00 ± 0,53	0,012	5,62 ± 0,49	0,004	6,25 ± 0,51	0,002	6,42 ± 0,48	0,002	≤ 3,50	MNV/ RAW 264.7
WC4 2013-02 J/G/R	4,38 ± 0,56	0,036	5,08 ± 0,43	0,007	5,08 ± 0,43	0,007	≥ 5,13	0,006	≤ 3,50	MVA/ BHK-21
	3,96 ± 0,61	n.s.	5,21 ± 0,61	0,011	6,33 ± 0,56	0,002	6,50 ± 0,50	0,002	≤ 3,50	HAdV-5/ A-549
	4,69 ± 0,47	n.s.	5,44 ± 0,53	0,042	5,94 ± 0,60	0,035	6,56 ± 0,52	0,023	≤ 2,50	PV-1/ BGM
	4,25 ± 0,52	n.s.	6,00 ± 0,51	0,003	6,25 ± 0,43	0,002	6,58 ± 0,43	0,001	≤ 3,50	MNV/ RAW 264.7
WC5 W ₂ C/C 08/12	1,75 ± 0,55	0,028	2,31 ± 0,56	0,037	2,63 ± 0,53	0,044	3,19 ± 0,51	n.s.	≤ 2,50	MVA/ BHK-21
	1,31 ± 0,62	<0,001	2,41 ± 0,61	0,001	3,03 ± 0,62	0,004	3,85 ± 0,58	n.s.	≤ 2,50	HAdV-5/ A-549
	0,99 ± 0,55	0,021	1,13 ± 0,64	0,025	1,13 ± 0,63	0,025	1,50 ± 0,59	0,027	≤ 2,50	PV-1/ BGM
	2,81 ± 0,54	n.s.	3,31 ± 0,51	n.s.	3,62 ± 0,51	n.s.	3,62 ± 0,56	n.s.	≤ 2,50	MNV/ RAW 264.7

5.2 Quantitative Real-Time-Polymerase Chain Reaction

Mit der Durchführung der q-RT-PCR wurden zwei Ziele verfolgt. Primär galt es, die Ergebnisse der Infektiositätsmessungen zu bestätigen und zu zeigen, dass durch die Inkubation der Modellviren mit den Wirkstoffen neben dem Virustiter auch die Kopien des viralen Genoms reduziert werden. Bei Erfüllung dieser Voraussetzung sollte die q-RT-PCR außerdem Erkenntnisse liefern, welche zur Aufklärung des Wirkmechanismus beitragen können. Wenn es gelingen würde, virales Genom sowohl im Überstand, als auch im Sediment der WC-Partikel nachzuweisen und die Summe der daraus näherungsweise der in der VK gemessenen Kopienzahl entspräche, könnte dies als Argument für die Adsorptionshypothese dienen. Dies würde bedeuten, dass die dem Überstand entzogenen Viren im Sediment der WC-Partikel gebunden sind.

5.2.1 Eichgerade

Für die Etablierung einer q-RT-PCR zum quantitativen Nachweis des viralen Genoms von PV-1 war die Aufnahme einer Eichgerade erforderlich. Es wurde hierfür in insgesamt acht Standardproben mit einer Kopienzahl von 10^9 bis 10^2 Kopien/ μ l der Ct-Wert bestimmt. Der zugehörige PCR-Lauf und die daraus ermittelten Ct-Werte sind in Abb. 24 (S. 74) bzw. Tab. 20 (S. 74) dargestellt. Der Ct-Wert ergab sich dabei als Mittelwert eines Triplikats. Mithilfe einer proportionalen Zuordnung, in der jeder Kopienzahl ein Ct-Wert zugewiesen wurde, konnte eine Gerade (siehe Abb. 25, S. 74) mit der Gleichung

$$f(x) = (-0,241) \times x + 9,677$$

erstellt werden. Diese Gleichung ermöglicht die Berechnung der Kopienzahl für jeden beliebigen Ct-Wert und war damit die Basis für alle weiteren Messungen. Eine zum Ausschluss unspezifischer Produktbildung durchgeführte Schmelzkurvenanalyse, welche in Abb. 26 (S. 75) dargestellt ist, ergab mehrheitlich eingipflige Schmelzkurven ohne Hinweis auf Entstehung unspezifischer Produkte. Lediglich bei einer sehr geringen Konzentration von 10^2 Kopien/ μ l wurde eine grenzwertig zweigipflige Schmelzkurve beobachtet. Diese Befunde zeigen eine q-RT-PCR, die v.a. bei geringer Kopienzahl in der zu untersuchenden Probe Einschränkungen der Spezifität aufweist.

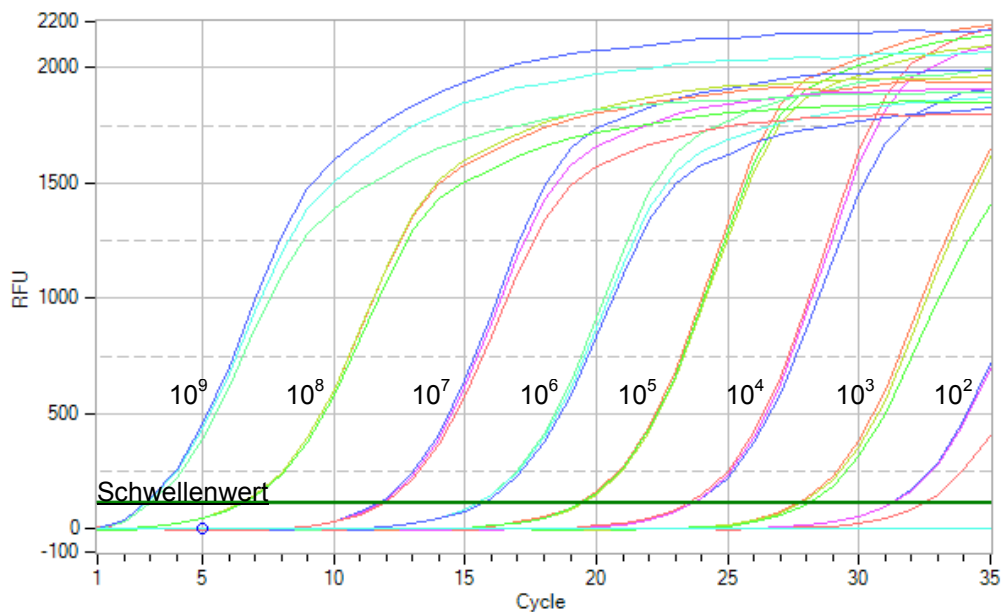


Abb. 24: q-RT-PCR-Lauf/ Eichgerade. Bestimmung der Ct-Werte aus den Standardproben. Diese enthielten 10^9 bis 10^2 Kopien/ μ l und wurden jeweils als Triplikate gemessen. Das Diagramm stellt die Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit des PCR-Zyklus dar. Der Ct-Wert für eine Probe ist dabei als der Zyklus definiert, bei dem die Fluoreszenz den Schwellenwert (dunkelgrüne Linie) überschreitet.

Tab. 20: Ct-Werte der Standardproben von 10^9 bis 10^2 Kopien/ μ l

Kopienzahl (Kopien/ μ l)		10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2
Ct-Wert	1. Messung	2,98	6,40	11,56	15,42	19,24	23,61	27,61	31,16
	2. Messung	2,80	6,34	11,67	15,39	19,39	23,53	27,72	31,21
	3. Messung	2,75	6,41	11,76	15,55	19,30	23,42	28,04	32,41
	Mittelwert	2,84	6,38	11,66	15,45	19,31	23,52	27,79	31,59

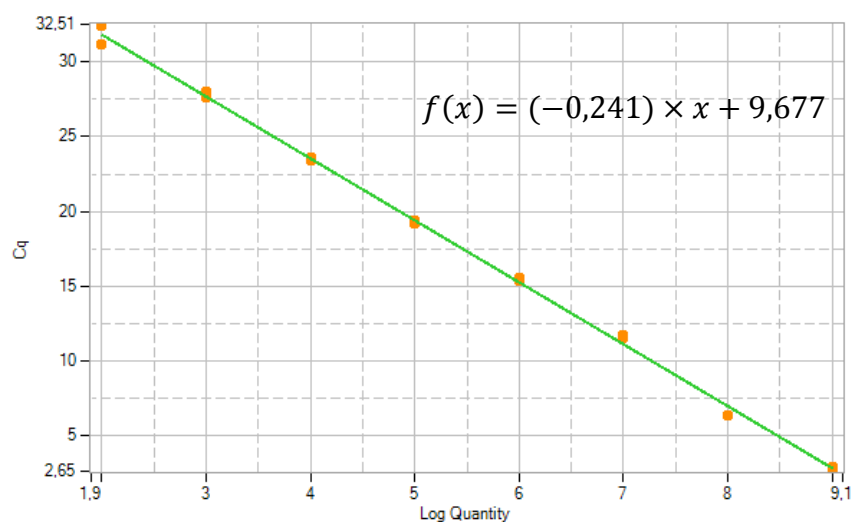


Abb. 25: Eichgerade. Die Eichgerade stellt die Ct-Werte in Abhängigkeit der Kopienzahl dar. Es zeigt sich hierbei, dass es sich um eine streng proportionale Beziehung handelt.

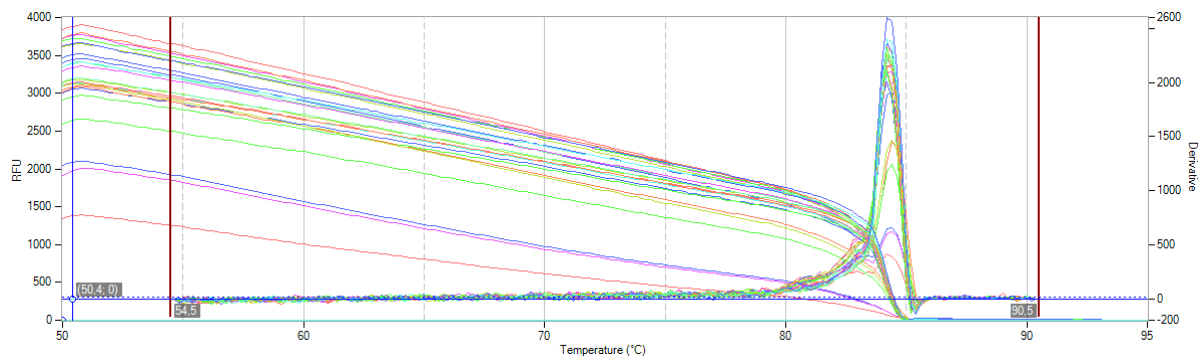


Abb. 26: Schmelzkurve/ Eichgerade. Bei kontinuierlicher Erhöhung der Temperatur verringern sich doppelsträngige DNA und die damit verbundene Fluoreszenz langsam. Durch Erreichen der spezifischen Schmelztemperatur des detektierten Fragments denaturiert schlagartig die verbliebene DNA. Dieser Prozess ist in der vorliegenden Abb. 26 direkt dargestellt und ergibt bei inverser Darstellung eine idealerweise eingipflige Schmelzkurve. Unspezifische Produktbildung macht sich aufgrund unterschiedlicher Fragmente mit verschiedenen Schmelztemperaturen durch gegeneinander verschobene Fluoreszenzkurven und zwei- oder mehrgipfelige Schmelzkurven bemerkbar.

5.2.2 Quantifizierung aus Proben des Suspensionsversuchs

Die Probengenerierung erfolgte auf der Basis eines Suspensionsversuchs mit WC1 als Wirkstoff und PV-1 als Modellvirus bei einer EWZ von 15 min. Neben der quantitativen Messung der Nukleinsäuren wurde parallel eine Virustitration auf Zellkulturen durchgeführt. Insgesamt wurden drei Einzelversuche unternommen, deren Ergebnisse in Tab. 21 zusammengefasst sind.

Aus den Daten (siehe Tab. 21, S. 76) wird deutlich, dass neben der Infektiosität auch die Kopienzahl des viralen Genoms reduziert wurde. Der Überstand des Prüfmittelansatzes zeigte bei einem Mittelwert von $10^{5,79}$ Kopien/ml einen bei 35 PCR-Zyklen gerade noch sichtbaren Anstieg der Fluoreszenzkurve (siehe Abb. 27, S. 77). Unter Berücksichtigung des in der VK gemessenen Mittelwerts von $10^{10,19}$ Kopien/ml berechnet sich eine Reduktion um $10^{4,40}$ Kopien/ml, welche auf einem Niveau von $p = 0,005$ signifikant $> 10^4$ ist. Demgegenüber waren im Sediment, mit der Ausnahme wahrscheinlich unspezifischer Produkte, keine Nukleinsäuren nachweisbar. Dieser fehlende RNA-Nachweis kann verschiedene Ursachen haben, wobei eine tatsächliche Abwesenheit viraler RNA die einfachste und wahrscheinlichste Erklärung darstellt. Dennoch muss auch an methodische Gründe gedacht werden wie z.B. eine begrenzte Sensitivität, wobei die noch vorhandene Kopienzahl unterhalb der Nachweisgrenze liegt. In zwei von neun Proben des Sediments wurden trotzdem Ct-Werte ermittelt, welche bei Interpretation in Kombination mit der Schmelzkurve als Ausdruck unspezifischer Produktbildung aufgefasst werden können. Für die Proben der VK ergaben die jeweiligen Schmelzkurven ein reines Profil, während bei den Proben des im Prüfmittelansatz gewonnenen Überstandes auch grenzwertig mehrgipfelige Schmelzkurven beobachtet wurden

(siehe Abb. 27, S. 77). Bei insgesamt drei Versuchen mit durchweg gleichen Ergebnissen war eine gute Reproduzierbarkeit gegeben und der beobachtete Effekt kann als relativ sicher angenommen werden.

Tab. 21: Zusammenfassende und vergleichende Darstellung des Verlaufs von viraler RNA und Virustiter im Rahmen eines Suspensionsversuchs mit WC1 und PV-1 nach einer EWZ von 15 min.

Probe	Einzelversuch	Ct-Wert ¹²	Kopienzahl (log ₁₀ Kopien/μl)	Kopienzahl (log ₁₀ Kopien/μl) ¹³	Kopienzahl (log ₁₀ Kopien/ml)	Virustiter (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)
Testansatz VK						
Überstand VK	1	14,57	6,17	7,17	10,17	9,13 ± 0,45
	2	14,72	6,13	7,13	10,13	9,13 ± 0,45
	3	14,16	6,26	7,26	10,26	9,63 ± 0,25
Mittelwert		14,48	6,19	7,19	10,19	9,30 ± 0,39
Testansatz Desinfektion (Zytotoxizität stets ≤ 2,50)						
Überstand Desinfektion	1	32,72	1,79	2,79	5,79	3,25 ± 0,44
	2	32,73	1,79	2,79	5,79	≤ 2,50
	3	32,74	1,79	2,79	5,79	4,63 ± 0,25
Mittelwert		32,73	1,79	2,79	5,79	3,46 ± 0,36
RF			4,40 ± 0,07			5,84 ± 0,49
Statistische Signifikanz (p-Wert) für RF > bzw. < 4			0,005			0,003
Statistische Signifikanz (p-Wert) für Unterschied zwischen Kopienzahl/ Virustiter			0,001			
Sediment Desinfektion	1	-	Kein Nachweis viraler RNA bzw. Nachweis unspezifisch			Kein Nachweis von Infektiosität
	2	-				
	3	-				
Mittelwert		-				

¹² Angabe als Mittelwert eines Triplikats

¹³ Unter Berücksichtigung einer Verdünnung von 1:10 im Reaktionsansatz

Die parallel durchgeführte Virustitration ergab in der VK einen Mittelwert von $9,30 \pm 0,39 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ und im Überstand des Prüfmittelansatzes bei leicht differierenden Werten einen Mittelwert von $3,46 \pm 0,36 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Dies entspricht einer Reduktion um $5,84 \pm 0,49 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Demgegenüber gelang aus dem Sediment

kein Nachweis von Infektiosität bzw. lebendem Virus. Es gibt, ähnlich wie beim Genomnachweis, mehrere mögliche Ursachen dieses fehlenden Nachweises von Infektiosität. Unter anderem wäre denkbar, dass eine Desorption der im Sediment gebundenen Viren durch Resuspension nicht möglich war.

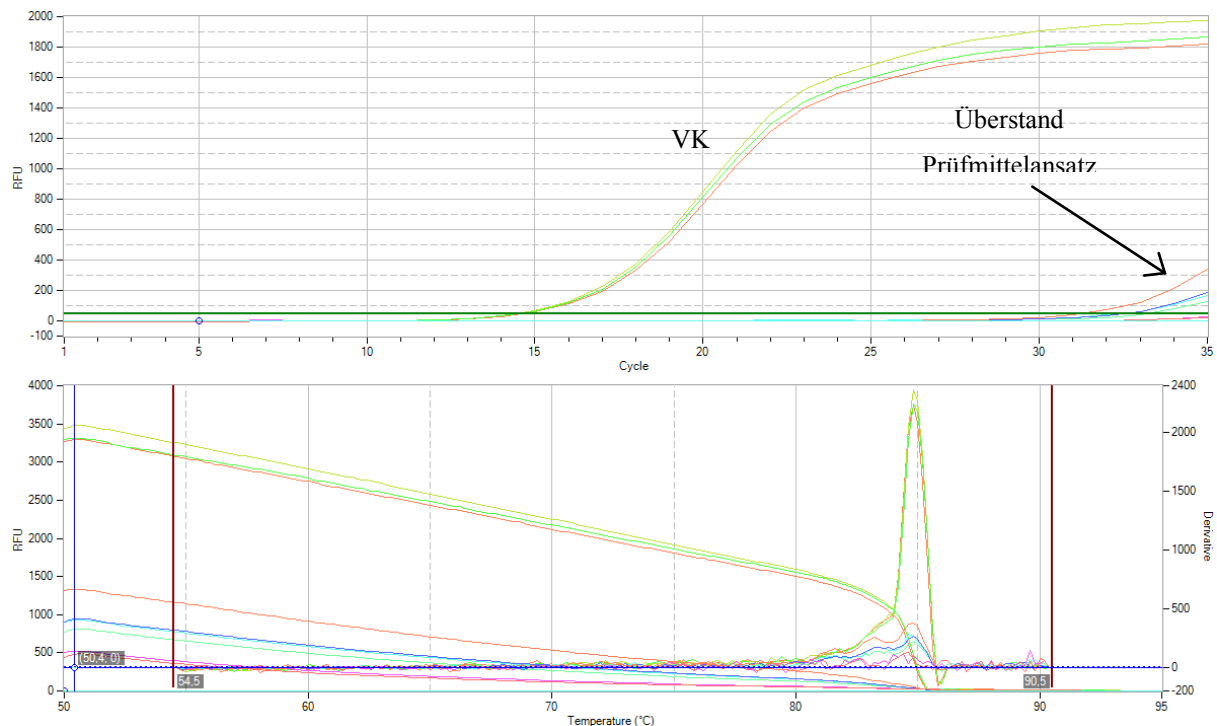


Abb. 27: q-RT-PCR-Lauf und Schmelzkurve/ Desinfektionsversuch. PCR-Lauf und Schmelzkurve sind für den zweiten von insgesamt drei Einzelversuchen exemplarisch dargestellt. Ein ähnliches Profil bot sich in den anderen zwei Versuchen.

In der Zusammenschau der Befunde wird klar, dass der quantitative Virusnachweis durch beide Methoden, nämlich Infektiositätstest und PCR, gelingen kann. Die Ergebnisse stimmen dabei gut miteinander überein, wobei die Kopienzahlen stets höher gemessen wurden als der Virustiter ($p = 0,001$). Die Unterschiede belaufen sich auf eine um den Faktor 4 bis 10 in der VK und 14 bis 348 im Überstand des Prüfmittelansatzes höhere Kopienzahl. Hierbei muss bedacht werden, dass im Infektiositätstest nur intakte und infektiöse Viren nachgewiesen werden, während die PCR durch den Nachweis der meist noch intakten Erbinformation auch tote und nicht-infektiöse Viruspartikel erfasst.

6 Diskussion

Die an viruzide DM zu stellenden Anforderungen sind hoch und setzen eine ausgeprägte und rasche Virusinaktivierung, entsprechend einer Titerreduktion um mindestens $4 \log_{10}$ TCID₅₀/ml, voraus. Diese Bedingung sollte idealerweise nicht nur für ein einziges Virus, sondern für ein breites Spektrum verschiedener Vertreter humanpathogener Viren, erfüllt sein. Nach der aktuellen deutschen Leitlinie gehören hierzu MVA und *Bovine Viral Diarrhea Virus* für den Bereich „begrenzt viruzid“ sowie zusätzlich PV-1, HAdV-5, *Simian Virus 40* und MNV für den Bereich „viruzid“ (Rabenau et al. 2015). Die wirksame Konzentration sollte möglichst niedrig sein, um eine ressourcenschonende Anwendung zu ermöglichen. Außerdem muss ein DM unter Anwendungsbedingungen ausreichend stabil bleiben und darf weder für den Menschen, noch für die Umwelt toxisch sein (Wallhäußer 1995). Andere Nebenwirkungen, wie die im Umgang mit aldehydhaltigen Produkten auftretenden Sensibilisierungs- und Reizerscheinungen sollten im Kontext des Arbeitsschutzes ebenso beachtet werden (Eickmann 2012). Es ist ein schwieriges Unterfangen, Stoffe zu finden, die alle genannten Eigenschaften in sich vereinigen. Die Industrie begegnet diesem Problem nicht zuletzt aus Kostengründen, indem sie in den von ihr vertriebenen DM mehrere Wirkstoffe auf der Basis verschiedener Mechanismen kombiniert (Lambert et al. 2003). Dadurch kommen in der Anwendung additive sowie synergistische Effekte zum Tragen, wobei eine insgesamt größere und schnellere Wirkung resultiert, als bei alleinigem Gebrauch einer Verbindung (Hugbo 1976, Johnston et al. 2003, Lambert et al. 2003, Leggett et al. 2015). Obwohl diese Strategie v.a. im Hinblick auf eine bakterielle Resistenzentwicklung sinnvoll ist, sollte sie nicht zu Lasten von Neuentwicklungen gehen. Außerdem stehen in Form der Nanotechnologie aussichtsreiche Möglichkeiten zur Verfügung, um eine Produktentwicklung voranzutreiben. Nanotechnologie-basierte Stoffe können gänzlich unbekannte Eigenschaften und Wirkungen zu Tage fördern und sind vielseitig einsetzbar. Die sich in der Literatur inzwischen häufenden Berichte über Nanostrukturen mit mikrobiozider und teilweise auch viruzider Wirksamkeit galten in der vorliegenden Arbeit als Anlass, eine Viruzidietestung diverser Nanostrukturen durchzuführen.

Die methodische Umsetzung der vorgenommenen Viruzidietestung erfolgte auf der Basis des von den Fachgesellschaften (DVV und RKI) empfohlenen quantitativen Suspensionsversuchs. Dieser Test verwendet Zellkulturen zur quantitativen Bestimmung der Infektiosität ohne sowie mit Einwirkung des zu prüfenden DM und erlaubt dadurch die Beurteilung einer potenziellen Wirkung. Letztere drückt sich als Differenz der in beiden Proben gemessenen

Infektiosität aus und wird als RF angegeben. Die Infektiosität kann dabei als indirektes Maß der Virusmenge aufgefasst werden und berechnet sich als Virustiter nach den Formeln von Spearman (Spearman 1908) und Kärber (Kärber 1931) in der Einheit TCID₅₀/ml. Die TCID₅₀ beschreibt diejenige und in einem ml enthaltene Virusmenge, die in 50 % der damit inokulierten Zellkulturen einen zpE hervorruft. Zur statistischen Absicherung wurden unter gleichen Testbedingungen jeweils zwei bis maximal fünf voneinander unabhängige Versuche durchgeführt und die Ergebnisse anschließend gemittelt. RF mit einem Wert signifikant $>$ bzw. $< 4 \log_{10}$ TCID₅₀/ml sowie signifikant unterschiedliche RF unter verschiedenen Testbedingungen wurden mithilfe von Ein- bzw. Zwei-Stichproben-T-Tests und Varianzanalysen ermittelt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zu insgesamt neun Proben verschiedenartig hergestellter und zusammengesetzter Nanostrukturen Daten gesammelt, welche die viruziden bzw. nicht-viruziden und zytotoxischen Eigenschaften dieser Proben darstellen. Die Versuche wurden unter Verwendung der Modellviren MVA, HAdV-5, PV-1 und MNV, welche für EWZ von 5, 15, 30 und 60 min gegenüber den Nanostrukturen exponiert wurden, durchgeführt. Belastungssubstanzen im Reaktionsansatz wurden dabei nicht eingesetzt. Exemplarisch konnte die Konzentrationsabhängigkeit mithilfe einer Dosis-Wirkungs-Kurve gezeigt werden, wobei die niedrigste und gerade noch wirksame Konzentration festgestellt wurde. Von ebenfalls exemplarischem Charakter war auch die Quantifizierung der viralen Nukleinsäuren durch q-RT-PCR, welche parallel zur Messung der Infektiosität erfolgte.

Der quantitative Suspensionsversuch kann als eine Art *Screening* verstanden werden, welcher eine rasche Einordnung in die Kategorien „wirksam“ und „nicht wirksam“ zulässt. Außerdem ermöglicht er einen Vergleich der Wirksamkeit verschiedener DM untereinander. Zur Beurteilung der Wirksamkeit im offenen Feld, welche auch Praxisbedingungen, Eiweißverschmutzungen und andere die Desinfektion behindernde Umstände berücksichtigt, muss der quantitative Suspensionsversuch durch weiterführende Testverfahren ergänzt werden. Unter Beachtung des vom CEN *Technical Committee* 216 vorgeschlagenen Stufenschemas wäre dies der nächste Schritt, um die Untersuchungen mit den in dieser Arbeit wirksam getesteten Nanostrukturen fortzusetzen. Es würde sich zu diesem Zweck der seit 2012 durch eine Leitlinie standardisierte Carrier-Test anbieten (Rabenau et al. 2012), dessen Eignung in einer Evaluationsstudie bestätigt wurde (Rabenau et al. 2014). Der Test untersucht

das Verhalten von DM unter den praxisnahen Bedingungen der Oberflächendesinfektion und kommt damit dem ursprünglichen Verwendungsgedanken der WC-Partikel nahe.

Die Viruzidietestung ist durch zahlreiche Störeinflüsse anfällig, welche eine Interpretation der Ergebnisse erschweren können. Demnach wurden zum Ausschluss störender Einflüsse die in der Leitlinie empfohlenen Kontrollversuche durchgeführt, die jedoch gleichzeitig Limitationen der Methodik aufzeigten. Das größte Hindernis stellte die Zytotoxizität der getesteten Nanostrukturen dar, die bei einem proben- und zellspezifischen Ausmaß in Virusverdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-4} auftrat. Um eine Virusreduktion von mindestens $4 \log_{10}$ TCID₅₀/ml nachweisen zu können, sind folglich hohe AVT der verwendeten Virussuspensionen notwendig. Diese konnten ohne bzw. erst mit UZ erreicht werden und waren in allen Ausgangsvirussuspensionen $> 8 \log_{10}$ TCID₅₀/ml. Einzige Ausnahme bildete eine das MVA enthaltende Suspension, welche bei der Testung der Silizium-Nanostrukturen mittlere Virustiter von $7,65 \pm 0,45 \log_{10}$ TCID₅₀/ml aufwies. Rückblickend waren bei der angesprochenen Versuchskonstellation jedoch keine höheren Virustiter erforderlich, da bei einem geringen bis fehlenden virusreduzierenden Effekt der Silizium-Nanostrukturen keinerlei Messeinschränkungen vorlagen. Dennoch waren relativ zu niedrige AVT von MVA in den anderen Versuchen unter Verwendung der WC-Proben problematisch. Komplizierend kam hinzu, dass sich die Vermehrung von MVA im Vergleich mit anderen Modellviren besonders schwierig gestaltete. Bei verhältnismäßig großem Aufwand mit Verwendung von viel zellulärem Substrat ließ sich im ZKÜ fast keine Zunahme des Virustiters beobachten. Selbst bei einer Anreicherung durch UZ war die Ausbeute erstaunlich gering. Der stärkste Anstieg um $1,10 \log_{10}$ TCID₅₀/ml wurde nach zweimaliger Passagierung im ZKÜ und anschließender UZ beobachtet. Dies ließ sich jedoch in Wiederholungsversuchen nicht mehr reproduzieren. In der Literatur findet man MVA-Vermehrungskurven mit verhältnismäßig stärkeren Titeranstiegen (Carroll und Moss 1997), die jedoch trotzdem nicht über die in dieser Arbeit maximal erreichten MVA-Virustiter von $8,75 \pm 0,35 \log_{10}$ TCID₅₀/ml hinauskommen. Aufgrund solcher Erfahrungen ist eine Optimierung der Vermehrungsfähigkeit von MVA anzustreben, um das Virus zum Zweck der Viruzidietestung noch besser nutzbar zu machen. Ähnliche Schwierigkeiten traten bei den anderen Modellviren nicht auf, sodass diese eine mit relativ starken Titeranstiegen assoziierte Vermehrung gewährten.

Die FA-Kontrolle war mit Ausnahme der Versuche, in denen MVA als Modellvirus zum Einsatz kam, problemlos durchführbar. Im Fall von MVA kamen jedoch mehrere Faktoren

zusammen, die eine Ergebnisinterpretation fast unmöglich machen. Im Vordergrund steht eine auf BHK-21-Zellen sehr hohe Zytotoxizität bis zu einer Virusverdünnung von 10^{-4} . Zusätzlich erschwerend sind die geringen AVT, die im Rahmen der FA-Kontrolle überraschenderweise deutlich niedriger gemessen wurden, als in allen bisher durchgeführten VK. Die beobachteten Differenzen wurden in ähnlicher Weise auch für andere Modellviren beobachtet, waren bei MVA jedoch am stärksten ausgeprägt und betrugen im Mittel $1,82 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Verantwortlich sind wahrscheinlich Gelfiltrationssäulen, welche zur Separation des FA vor der Titration eingesetzt wurden. Offensichtlich kam es in den Säulen zu einer partiellen Retention von Viren mit der Folge, dass niedrigere Virustiter gemessen wurden. Dieses Problem wurde mehrfach berichtet, sodass die DVV hierzu Stellung bezog. Sie kam dabei zu der Schlussfolgerung, dass Titerdifferenzen von bis zu $3 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, welche in Vergleichsmessungen von filtrierten gegenüber unfiltrierten Suspensionen festgestellt wurden, möglich sind (DVV 2013). Solche Differenzen wurden in dieser Arbeit im Zusammenhang mit MVA gesehen und zeigen, dass der Virusnachweis durch die Benutzung der Säulen empfindlich gestört sein kann. In der Summe führten die genannten Umstände dazu, dass für FA gegenüber MVA ein RF von höchstens $2,54 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ gemessen wurde. Diesen Daten entsprechend wäre FA gegen MVA nicht wirksam. Aus unterschiedlichen Quellen ist jedoch bekannt, dass eine ausreichende Desinfektion von Vacciniaviren mit gebräuchlichen DM wie FA und Ethanol leicht erreichbar ist, wobei für Anwendungszwecke 2 % FA über mindestens 5 min zur Desinfektion empfohlen werden (von Rheinbaben 2007, Moller et al. 2015). Dennoch sind die beschriebenen Probleme keine Rarität. So hatten Rabenau et al. in ihren Versuchen einer FA-Desinfektion des Vacciniavirus ähnliche Schwierigkeiten, RF $> 4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ nachzuweisen (Rabenau et al. 2010). Unter Verwendung anderer Modellviren konnten die RF dagegen uneingeschränkt erhoben werden. Für die stabileren Vertreter HAdV-5 und MNV konnten nach 30 und 60 min RF von $4,81 \pm 0,49$ und $\geq 5,07 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ bzw. $2,08 \pm 0,53$ und $2,92 \pm 0,54 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ermittelt werden. Ähnliche Werte einer Virusreduktion von FA gegenüber HAdV-5 in Höhe von $\geq 5,03$ nach 30 und 60 min wurden in der Literatur beschrieben (Valot et al. 2000, Moller et al. 2015). Für MNV wurde von ähnlichen und z.T. höheren RF berichtet (Moller et al. 2015), die durch die ebenfalls höhere Anwendungskonzentration von FA in der zitierten Studie bedingt sein könnten. Für PV-1 liegen RF von $1,44 \pm 0,65$ und $2,26 \pm 0,56 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ nach 30 bzw. 60 min vor, welche sich innerhalb der in der Leitlinie vorgeschlagenen Intervalle bewegen (Rabenau et al. 2015).

Insgesamt waren die Kontrollversuche durch zufriedenstellende Ergebnisse geprägt, sodass die im Reaktionsansatz von Modellvirus und Nanostrukturen beobachteten Virusreduktionen mit hoher Wahrscheinlichkeit tatsächlich auf die Einwirkung der getesteten Nanostrukturen zurückführbar sind. Unsicherheiten ergaben sich v.a. in den Versuchen mit MVA.

Die auf der Basis von Silizium hergestellten Nanopartikel erbrachten eindeutige Ergebnisse, die allerdings eine Eignung als DM ausschließen. Auf der Basis von vier Proben können zwei Gruppen gebildet werden, die eine bessere Einordnung der Ergebnisse zulassen. In der einen Gruppe befinden sich die faserähnlichen SiNWs, welche im quantitativen Suspensionsversuch gegenüber MVA wirkungslos waren. Die gemessenen RF weichen zu keiner EWZ von 5 bis 60 min signifikant von der Nulllinie ab und sind Ausdruck der natürlichen Messvariabilität. Die andere Gruppe beinhaltet zwei unterschiedlich konzentrierte Proben mesoporöser SiNPs, die zwar durch Wirkung, jedoch nicht durch eine mindestens 4 \log_{10} -Stufen $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ umfassende Wirksamkeit gekennzeichnet sind. Durch ihre Einwirkung konnte für alle EWZ eine signifikante Virusreduktion $> 0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ festgestellt werden, wobei der Effekt durchschnittlich Werte im Bereich von $0,71 \pm 0,60$ bis $0,96 \pm 0,57 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ annahm. Ähnliche Werte einer um 50 % reduzierten Virusmenge wurden mit den gleichen Partikeln gegenüber HIV und RSV berichtet (Osminkina et al. 2014b). Obwohl in beiden Gruppen der Silizium-Nanostrukturen keine Wirksamkeit festgestellt wurde, gab es signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Diese lassen sich wahrscheinlich durch ihre unterschiedliche Herstellung und Morphologie begründen, welche bei der Wirkung eine Rolle zu spielen vermögen. Unter der Annahme der von Osminkina et al. postulierten Adsorptionshypothese (Osminkina et al. 2014b) erscheint es plausibel, dass Nanopartikel stärker um Virionen agglomerieren, als dies bei Fasern einer Länge mehrerer μm vorstellbar ist. Letztendlich muss betont werden, dass die Effekte von geringem Wert sind und nicht für eine Eignung als DM ausreichen. Dies lässt sich anhand eines Beispiels verständlich machen, das die Virämie bei HIV- sowie HCV-seropositiven Patienten berücksichtigt. Diese kann ein starkes Ausmaß (Median: $1,5 \times 10^4$ bzw. $1,9 \times 10^4$ Kopien/ml) annehmen, wobei erhebliche Schwankungen mit maximalen Konzentrationen von $2,5 \times 10^5$ (HIV) bzw. $3,3 \times 10^6$ (HCV) Kopien/ml möglich sind (Liuzzi et al. 1996, Operskalski et al. 2003). Während die Übertragungswahrscheinlichkeit bei HIV ab 400 Kopien/ml konzentrationsabhängig zunimmt (Quinn et al. 2000), scheint bei HCV selbst bei fehlendem Nachweis viraler RNA und damit bei noch geringerer Konzentration eine hohe Übertragungsrate vorzuliegen (Operskalski et al. 2003). In den Körperflüssigkeiten infektiöser Patienten können Erregerkonzentrationen

demnach so hoch sein, dass selbst eine Reduktion um $4 \log_{10}$ TCID₅₀/ml nicht ausreichen würde, um eine Infektionsgefahr sicher auszuschließen.

Im Gegensatz dazu demonstrierten die WC-Partikel einen eindrucksvolleren viruziden Effekt. Für vier von insgesamt fünf Proben konnte reproduzierbar eine deutliche, oft weit über eine Titerreduktion von $4 \log_{10}$ TCID₅₀/ml hinausgehende, Wirksamkeit belegt werden. Diese gilt für WC1, WC2 und WC4 universell gegen alle Modellviren ab 15 min, während WC3 selbiges nur gegen HAdV-5 und MNV erreicht und WC5 unter keiner Konstellation. Diese Unterschiede machen eine Einteilung der einzelnen Proben in Gruppen erforderlich:

1. „umfassend wirksam“: Die sich nahezu ähnlich verhaltenden Proben WC1, WC2 und WC4 können der Gruppe „umfassend wirksam“ zugeordnet werden.
2. „eingeschränkt wirksam“: WC3 zeichnet sich dagegen durch ein individuelles Profil aus und gilt aufgrund diskreter Wirksamkeitsgrenzen als „eingeschränkt wirksam“.
3. „unwirksam“: WC5 war als einzige Probe unter keiner Konstellation wirksam.

Bei den in Gruppe 1 getesteten Proben war eine EWZ von 5 min zumeist nicht ausreichend, um eine den Anforderungen genügende Desinfektion zu erreichen. Dennoch konnte diese vereinzelt beobachtet werden, beispielsweise bei WC2 gegenüber MNV ($5,62 \pm 0,65 \log_{10}$ TCID₅₀/ml) oder bei WC4 gegen MVA ($4,38 \pm 0,56 \log_{10}$ TCID₅₀/ml), und lässt bereits ein größeres viruzides Potenzial bei längerer Einwirkung vermuten. WC1 blieb demgegenüber nach 5 min immer unterhalb der Wirksamkeitsgrenze. Die nach 5 min oftmals knapp verfehlte oder unsichere Wirksamkeit, wich nach 15 min in allen Bereichen einem überzeugenden Effekt. Alle Proben dieser Gruppe waren gegen alle Modellviren signifikant wirksam. 15 min können als kritische EWZ betrachtet werden, deren Einhaltung für eine ausreichende Desinfektion unentbehrlich ist. Von vergleichbar hoher und sogar höherer Wirksamkeit wurde bereits in Untersuchungen mit halogenierten metalloxid-basierten Nanopartikeln berichtet (Haggstrom et al. 2010, Koper et al. 2002), wobei anzunehmen ist, dass die oxidativ wirkenden Halogene in Form von Cl₂ oder Br₂ maßgeblich zur Wirksamkeit beitragen (Koper et al. 2002). Die hier getesteten WC-Partikel sind dagegen auch ohne oxidative Hilfe von Halogenen wirksam. Bei den EWZ 30 und 60 min konnte bei allen WC-Proben dieser Gruppe ein weiterer Anstieg des RF festgestellt werden, sofern die Messung nicht durch Einschränkungen der Zytotoxizität behindert wurde. Die zwischen den EWZ vorliegenden Differenzen der RF sind für alle Konstellationen signifikant und bringen dadurch eine strenge Zeitabhängigkeit der Wirkung zum Ausdruck. Unterschiede zwischen den RF bei

verschiedenen Modellviren sind mehrheitlich nicht signifikant und falls sie auftreten, betragsmäßig klein, sodass für WC1, WC2 und WC4 von einem unspezifischen Wirkmechanismus ausgegangen werden muss. Als diskussionswürdig gilt die vordergründig in dieser Gruppe beobachtete Ansäuerung von WSH. Im Rahmen der Suspension sank der pH-Wert in den Bereich von 3, während eine vergleichbar starke Erniedrigung des pH-Werts bei den schlechter wirksamen Proben WC3 und WC5 nicht stattfand. Zusammen mit der gegenüber den Modellviren demonstrierten Unspezifität legt dies die Vermutung nahe, dass die Virusinaktivierung säurebedingt erfolgt. Die Annahme eines darauf beruhenden Wirkmechanismus ist jedoch insofern unwahrscheinlich, da es sich bei den verwendeten Modellviren mehrheitlich um säurestabile Viren handelt. Für Adenoviren finden sich in der Literatur Angaben, wonach diese bei niedrigeren pH-Werten sogar stabiler sind (Galdiero 1979, He et al. 2010). Die meisten Enteroviren bleiben bei pH 3,0 stabil, während das Poliovirus pH-Werte bis 1,5 unbeschadet übersteht (Bachrach und Schwerdt 1952). Ähnlich verhält es sich mit MNV, das bis pH 2,0 stabil ist (Cannon et al. 2006). Unter Berücksichtigung, dass der natürliche Infektionsweg dieser Viren das saure Milieu des Magens passiert, erscheinen die Daten nicht verwunderlich. MVA als Pockenvirus toleriert allerdings nur pH-Werte bis 4,5 (von Rheinbaben 2007), sodass die probenbedingte Ansäuerung tatsächlich einen Anteil an der Virusreduktion gehabt haben könnte.

Bei WC3 blieb der pH-Wert unverändert und es präsentiert sich ein gänzlich anderes Bild. Während mit WC3 gegenüber HAdV-5 und MNV die höchsten bzw. zweithöchsten RF erreicht wurden, zeigte sich gegenüber MVA eine schwächere und gegenüber PV-1 eine noch schwächere Wirkung. Diese je nach Modellvirus unterschiedlich hohen RF sind alle signifikant verschieden, sodass dies als Spezifität von WC3 für einige Modellviren aufgefasst werden kann. Ein unterschiedlich starker virusinaktivierender Effekt bei verschiedenen Modellviren wird auch für viele etablierte DM beobachtet und beruht u.a. auf dem unterschiedlichen Resistenzverhalten der Modellviren. Dieses wurde bereits im Schema von Klein und Deforest beschrieben, welches die Viren nach zunehmender Chemoresistenz in drei Gruppen von A bis C einordnet (Klein und Deforest 1983). Entsprechend diesem Schema gilt das Vacciniavirus als sensitiv und nimmt seinen Platz in der Gruppe A ein. Adenoviren werden nur noch als moderat-sensitiv eingestuft und gehören zur Gruppe B. Als besonders kleine sowie unbehüllte Viren gehören PV-1 und das den Caliciviren zugehörige MNV zu den hochresistenten Vertretern der Gruppe C (Prince et al. 1991). WC3 folgt nur teilweise diesem Muster, indem es sich zwar gegen PV-1 als unwirksam erwies, jedoch auch gegenüber MVA

nach 5 min nur eine geringe Virusreduktion erreichte. MNV als eigentlich resistenter Vertreter wurde wiederum sehr gut inaktiviert. Eine zeitabhängige Wirkung ist bei WC3 Teil seiner Wirkungskinetik und ist für alle Modellviren signifikant. Auffällig ist eine, verglichen mit den anderen Proben, höhere Zytotoxizität zwischen $\leq 3,50$ und $\leq 4,50 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Diese war v.a. in den Messungen mit MVA und HAdV-5 problematisch und schränkte den Messbereich ein. Es ist erstaunlich, dass WC3 trotz seiner höheren Zytotoxizität ein im Vergleich mit den Proben WC1, WC2 und WC4 eingeengtes Wirkspektrum aufweist. Dies widerspricht der Regel, dass aufgrund übereinstimmender Zielstrukturen auf Zellen und Viruskapsiden eine höhere Zytotoxizität mit einem stärkeren viruziden Effekt assoziiert ist

WC5, welches zu einer leichten Ansäuerung führte, war gegenüber keinem der Modellviren sowie bei keiner der EWZ wirksam. Die RF demonstrieren dennoch eine Inaktivierung der Viren, welche allerdings mehr Zeit in Anspruch nimmt. Nach 60 min wurden mittlere RF von $3,19 \pm 0,51$, $3,85 \pm 0,58$ und $3,62 \pm 0,56$ gegenüber MVA, HAdV-5 und MNV ermittelt, womit bei längeren EWZ über 60 min mit einer Überschreitung der Wirksamkeitsgrenze gerechnet werden kann. Da DM mit derart langen EWZ wenig praxistauglich sind, wurde auf die Messung bei noch längeren EWZ verzichtet. Für PV-1 wurde die insgesamt niedrigste Reduktionsrate beobachtet, die über die EWZ hinweg kaum Veränderungen zeigt und einer Stagnation gleichkommt. Die geringe virusinaktivierende Wirkung korreliert im Fall von WC5 wiederum gut mit der ebenfalls geringen Zytotoxizität von $\leq 2,50 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Proben der Gruppe „umfassend wirksam“ hervorstechen und durch eine starke wie breite Wirksamkeit überzeugen. Sie verhalten sich ähnlich untereinander, jedoch deutlich unterschiedlich im Vergleich mit WC3 und WC5. Die diesen unterschiedlichen und teilweise charakteristischen Wirkungsprofilen zugrunde liegenden Ursachen sind unbekannt. Um hierzu weitere Aussagen machen zu können, wäre eine bessere Kenntnis der einzelnen Proben notwendig. Da es diesbezüglich an Informationen fehlt, können nur Spekulationen zu vermeintlichen Ursachen gemacht werden, welche sich im Wesentlichen auf minimale Variationen der Produktionsbedingungen stützen. Für alle Proben bleibt anzumerken, dass sich die Reproduktion von Einzelergebnissen schwierig gestaltete. Größere Schwankungen sind dabei am wahrscheinlichsten auf eine schwierige Handhabbarkeit der Proben zurückführbar. Diese lagen in Suspension nur bei ständiger Durchmischung feinverteilt vor, sodass die im jeweiligen Reaktionsansatz vorliegende Konzentration zwischen den Versuchen variieren konnte und damit auch der

gemessene RF. Im Allgemeinen bleibt die teilweise große Streuung zwischen Einzelergebnissen eine Schwachstelle des quantitativen Suspensionsversuchs. Dies sollte bei zukünftigen Modifikationen der Leitlinie zur Viruzidietestung stärker Beachtung finden.

Als weiterführende Experimente zur Beschreibung eines Wirkungsprofils wurden auch differente Konzentrationen der WC-Partikel geprüft. Während bei allen anderen Versuchen Konzentrationen von 100 mg/ml zur Anwendung kamen, wurden im Rahmen dieser Experimente zusätzlich Konzentrationen von 10, 50 sowie 80 mg/ml getestet. Die Auswahl höherer Konzentrationen erscheint wenig sinnvoll, da hierunter eine höhere Zytotoxizität zu erwarten wäre. Die Daten wurden exemplarisch für WC4 gegen PV-1 nach 15 min erhoben. 15 min sind insofern geeignet, da die EWZ im Sinne der Praxistauglichkeit bei gleichzeitig ausreichender Wirksamkeit möglichst kurz sein soll. Dies trifft für die meisten Proben der WC-Partikel nach 15 min zu. Als Modellvirus sollte ein resistenter Vertreter ausgewählt werden und als Wirkstoff derjenige, der sich durch hohe Wirksamkeit auszeichnet. WC4 und PV-1 qualifizierten sich nicht zuletzt auch deswegen, weil ihre Kombination eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zuließ. Die exemplarische Testung ist legitim, da davon auszugehen ist, dass aufgrund der Ähnlichkeit der Proben eine Verallgemeinerung möglich ist. Das bedeutet, dass wahrscheinlich für alle anderen Kombinationen von Wirkstoff, Modellvirus und EWZ ähnliche, die Kinetik betreffende, Ergebnisse ermittelt würden. Für die minimal wirksame Konzentration gilt dies natürlich nicht, da diese sich je nach Wirkstoff, Modellvirus und EWZ verschieben kann. Bei graphischer Darstellung der RF in Abhängigkeit der Konzentration entsteht eine Kurve, welche eine hohe Ähnlichkeit mit der die Zeitabhängigkeit darstellenden Kurve besitzt. Bei niedrigen Konzentrationen führen bereits kleine Veränderungen zu einer deutlichen Veränderung des Effekts, während bei höheren Konzentrationen ab 100 mg/ml kaum noch Effektveränderungen auftreten. Die Ergebnisse entsprechen damit den Erwartungen und stimmen mit den allgemeinen Prinzipien zur Wirkung von DM, zu denen auch Konzentrations- und Zeitabhängigkeit gehören, überein (Wallhäußer 1995). Die minimale Konzentration, bei der noch Wirksamkeit vorliegt, betrug für WC4 gegenüber PV-1 nach 15 min etwa 56 mg/ml. Daraus folgt, dass auch rund 60 % der Standardkonzentration von 100 mg/ml ausreichen würden, um mit WC4 gegen PV-1 nach 15 min Wirksamkeit zu erreichen. Die hier erzielten Ergebnisse können bei zwei bzw. drei Versuchen keine exakte Dosis-Wirkungs-Beziehung ergeben. Um diesen Anspruch zu erfüllen, wären weitere Wiederholungen notwendig. Im Sinne des ursprünglichen Ziels,

nämlich ein wichtiges Wirkungsprinzip und den positiven Zusammenhang von Konzentration und Wirkung aufzuzeigen, können die Versuche jedoch als erfolgreich gewertet werden.

Beim Nachweis einer Zerstörung der viralen Nukleinsäuren kann eine Infektiosität sicher ausgeschlossen werden (Charrel et al. 2001). Demzufolge stellt die q-RT-PCR eine geeignete Methode dar, die Inaktivierung von Viren durch DM zu testen. Ihre Bedeutung hat sie v.a. als hilfreiche Alternative, wenn Infektiositätsassays aufgrund fehlender Kultivierbarkeit von Viren nicht möglich sind. Insbesondere bei Wirksamkeitsprüfungen gegenüber HBV, HCV und humanem Norovirus wurde vom erfolgreichen Einsatz dieser Methode berichtet (Charrel et al. 2001, Jursch et al. 2002, Mormann et al. 2015). Ihre Anwendung in der vorliegenden Arbeit sollte neben dem Nachweis der Zerstörung viraler Nukleinsäuren einen Beitrag zur Aufklärung des Wirkmechanismus leisten. Zu diesem Zweck wurde ein Ansatz mit exemplarischem Charakter gewählt, der als Versuchskonstellation eine Kombination aus WC1, PV-1 und der EWZ 15 min beinhaltete. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass neben dem Virustiter, als Maß für die Infektiosität, zusätzlich die Kopien des viralen Genoms reduziert wurden. Obwohl in der Literatur die Meinung vorherrscht, dass „nackte“ Nukleinsäuren nicht infektiös sein können, schließt eine vollständige Virusinaktivierung streng genommen die Zerstörung seiner Erbinformation mit ein (Quinn 1992). Diese Ansicht gilt als umstritten, da die Reduktion der Infektiosität letztlich das entscheidende Kriterium ist. Eine zusätzliche Zerstörung des viralen Erbguts stellt zudem hohe Anforderungen an ein DM und lässt sich meist nicht erreichen. Am Beispiel verschiedener Adenovirus-Serotypen konnte gezeigt werden, dass selbst bei deutlicher Reduktion der Infektiosität durch DM mit ausgeprägtem viruziden Effekt das virale Erbgut intakt bleiben kann (Sauerbrei et al. 2004a). In der vorliegenden Arbeit erhärtet der fehlende RNA-Nachweis aus dem Sediment die Vermutung, dass eine Zerstörung der viralen Nukleinsäuren stattfindet. Läge die eingangs vermutete Adsorption von WC-Partikeln an Virionen zugrunde, hätte der RNA-Nachweis aus dem Sediment gelingen müssen. Die Adsorptionshypothese wird durch die vorliegenden Befunde demnach geschwächt, kann jedoch trotzdem nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zusätzlich müssen andere und v.a. methodisch bedingte Gründe für den fehlenden RNA-Nachweis im Sediment bedacht werden. Es besteht z.B. die Annahme, dass die WC-Partikel einen Bestandteil der verwendeten Kits hemmen und dadurch den RNA-Nachweis stören. Zukünftig bedürfen solche Störfaktoren des Ausschlusses, um eine bessere Interpretation zu ermöglichen. Die Ergebnisse der parallel durchgeführten Virustitration zeigen eine gute Übereinstimmung mit den gleichzeitig gemessenen Kopienzahlen. Es liegt

ein deutlicher Zusammenhang vor, wobei die Kopienzahlen in der VK um den Faktor 4 bis 10 höher waren, als der zugehörige Virustiter. Im Überstand des Prüfmittelansatzes waren die Kopienzahlen sogar um den Faktor 14 bis 348 höher. Diese Beobachtungen zeigen lediglich, dass nicht jedes Virion infektiös ist. Es handelt sich um ein bekanntes Phänomen, wobei die Kopienzahl sogar um den Faktor 1.000 größer sein kann (Kaaden und Mahnel 1993).

In der Zusammenschau aller Ergebnisse bleiben drei Proben übrig, welche sich durch ihre außergewöhnlichen viruziden Effekte auszeichnen. Dazu gehören von den WC-Partikeln die Proben WC1, WC2 und WC4. Diese erfüllen viele der zu Beginn erwähnten Anforderungen an DM, obwohl sie wenig mit etablierten DM zu tun haben und als Feststoffpartikel nicht wasserlöslich sind. Dennoch überzeugen die getesteten Proben durch ihre ausgeprägten sowie breiten Effekte und werfen gleichzeitig neue Fragen auf. Ungeklärt bleibt z.B. der Wirkmechanismus, der im Zentrum weiterer Untersuchungen stehen sollte. Um diesbezüglich weitere Erkenntnisse zu sammeln, könnten elektronenmikroskopische Aufnahmen hilfreich sein. Gelänge dabei eine gemeinsame Darstellung von Viren und WC-Partikeln, könnten weitere Aussagen zum Interaktionsverhalten, i.S.e. Adsorption oder Strukturschädigung der Viren, gemacht werden. Substanzen, die Infektiosität und virale Nukleinsäuren derart hocheffizient reduzieren, machen die Ursachenforschung zu einer anspruchsvollen wie spannenden Aufgabe. Die Diskrepanz zwischen Wirkung und Wirkmechanismus ist jedoch keine Seltenheit und so bleiben selbst für viele etablierte DM die genauen Abläufe der Virusinaktivierung unbekannt (McDonnell und Russell 1999). Die meisten Verbindungen haben letztlich aufgrund von Erfahrungen und ihres historischen Einsatzes Einzug in die Desinfektionspraxis erhalten und sind nachträglich in experimentellen Verfahren als wirksam validiert worden. Für die WC-Partikel bedeutet dies, dass auch zu deren Wirkmechanismus weiterhin nur Spekulationen möglich sind. Dabei gilt die Adsorptionshypothese als am wahrscheinlichsten, wobei die in der q-RT-PCR ermittelten Ergebnisse die Annahmen weder stützen, noch ausschließen konnten. Entsprechend der Adsorptionshypothese tragen Größe und Morphologie der Partikel entscheidend zur Wirksamkeit bei, während die chemische Zusammensetzung vielmehr als Cofaktor rangiert. Angewandt auf die geprüften Proben ist jedoch nicht sicher, ob Nanogröße oder WC der Faktor zur Wirksamkeit ist. Wahrscheinlich bedarf es einer optimalen Kombination von beidem, wobei die Stoffzusammensetzung die zur Adsorption notwendigen Bindungseigenschaften ermöglicht, während Partikelgröße sowie Oberflächeneigenschaften eine Agglomeration herbeiführen. Andere Studien, in denen ähnliche Effekte für eine ganze Reihe verschiedener Metalloxide festgestellt wurden, lassen

die Bedeutung der chemischen Zusammensetzung zweitrangig erscheinen (Koper et al. 2002). Dementsprechend könnte man schlussfolgern, dass Wolframoxid anstelle des WC genauso gut wirksam ist. Dies kann sogar eine realistische Alternative zum WC darstellen, da eine reproduzierbare Herstellung der getesteten WC-Partikel wahrscheinlich nicht mehr möglich ist (Hoyer 2015b, pers. Mitteilung). Dass die chemische Zusammensetzung doch bedeutsam ist, zeigen wiederum die mit den Silizium-Nanostrukturen gemachten Erfahrungen.

Neben dem Wirkmechanismus steht eine zweite wichtige Frage im Raum und zwar wie man die als wirksam getesteten Proben einer Anwendung zuführen kann. Die ursprüngliche Absicht bestand in einer Verwendung zur Oberflächendesinfektion, wobei durch die Einarbeitung solcher Proben in Instrumente und Flächen viruzide Oberflächen entstehen sollten. Eine derartige Anwendung setzt jedoch Wirksamkeit unter den Praxisbedingungen der Oberflächendesinfektion voraus, die in ergänzenden Testverfahren belegt werden müsste. Insgesamt erscheint die Umsetzung dieser Idee aufgrund hoher zu erwartender Kosten, schlecht nachweisbarer tatsächlicher Wirksamkeit im Feld sowie einer geringen Bedeutung der Übertragung viraler Infektionen durch Oberflächen derzeit unrealistisch. Es existieren bessere Alternativen, sodass eine Anwendung im klinischen Alltag aktuell weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Eine größere Zukunftsperspektive dieser Partikel liegt in der virologischen Forschung. Unter der Voraussetzung einer zutreffenden Adsorptionshypothese könnten Verfahren entwickelt werden, welche auf der Basis von Virusadsorption und -desorption zur effektiveren Anreicherung von Viren genutzt werden. Dies könnte z.B. mithilfe von Filtern gelingen, die eine aus den Partikeln hergestellte Matrix enthalten. Die Viren einer Suspension würden daran immobilisiert und durch die Veränderung der Umgebungsbedingungen, z.B. des pH-Werts, wieder freigesetzt werden. Ebenso könnten solche Filtersysteme in der Herstellung von Biopharmaka (Asper et al. 2015) oder bei der Desinfektion von Trinkwasser (De Gusseme et al. 2010) Anwendung finden. Letztendlich ist nicht gesichert, ob sich die Partikel in eine Anwendung bringen lassen und sich dann gegenüber etablierten Verfahren durchsetzen. Es ist jedoch nicht unüblich, dass für neu entdeckte Mittel erst Jahre später eine Anwendung gefunden wird. Beispielhaft seien hier die Interferone genannt, die bereits viele Jahre entdeckt waren (Isaacs und Lindenmann 1957), bevor man sie mit den Methoden der Gentechnologie herstellen konnte und ihren therapeutischen Nutzen z.B. im Rahmen der Multiplen Sklerose erkannte (Jacobs et al. 1987). In diesem Sinne erscheinen Erfolge in der Zukunft aussichtsreich, die durchaus neue Anwendungszwecke bereithalten können.

7 Schlussfolgerungen

1. Nanopartikel aus WC besitzen eine viruzide Wirksamkeit, die bei einem raschen Wirkungseintritt gegenüber einem großen und v.a. unterschiedlichen Spektrum von Modellviren gilt. Sie erfüllen demnach die Wirksamkeitsanforderungen an ein DM, welche durch die Leitlinie von DVV und RKI sowie durch die EN 14476 definiert sind.
2. Die Kinetik der Virusinaktivierung folgt dabei den allgemeinen Prinzipien, welche auch für alle wasserlöslichen DM gelten. Es kann eine ausgeprägte Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden. Außerdem zeigen sich Wirkungsunterschiede bei verschiedenen Modellviren, die sich jedoch vornehmlich subtil darstellen.
3. Neben der Fähigkeit zur Reduktion der Infektiosität konnte eine ähnlich starke und den Wirksamkeitsanforderungen entsprechende Reduktion der Kopienzahl des viralen Genoms nachgewiesen werden, wodurch eine zusätzliche Güte sowie Sicherheit der Desinfektionsmaßnahme resultiert.
4. Da die erhobenen Daten auf dem quantitativen Suspensionsversuch beruhen und ohne Belastungszusätze erhoben wurden, sollten die Untersuchungen zur Vervollständigung des Wirkungsprofils mit Belastungszusätzen sowie unter praxisnahen Bedingungen fortgesetzt werden.
5. Ebenso sollte die Aufklärung des Wirkmechanismus im Zentrum weiterer Untersuchungen stehen, da aktuell nur Spekulationen diesbezüglich möglich sind. Diese Untersuchungen sollten unter Berücksichtigung der als am wahrscheinlichsten geltenden Adsorptionshypothese geplant und durchgeführt werden.
6. Mögliche Anwendungen für Nanopartikel aus WC gilt es noch zu finden, wobei insbesondere Filtersysteme eine attraktive Möglichkeit darstellen. Weitere Forschungsthemen können auch die Entwicklung solcher WC-basierten Filter zum Ziel haben.
7. Da eine reproduzierbare Herstellung der hier getesteten WC-Nanopartikel unwahrscheinlich ist, sollte zusätzlich auf alternative Möglichkeiten ausgewichen werden. Wolframoxid könnte eine solche Möglichkeit sein.
8. Nanopartikel aus Silizium können die Wirksamkeitsanforderungen demgegenüber nicht erfüllen, trotzdem sie eine geringfügig ausgeprägte Fähigkeit zur Virusinaktivierung besitzen. Zu Desinfektionszwecken ist diese jedoch ungenügend.

8 Quellen- und Literaturverzeichnis

- Altenburger W, Suter CP, Altenburger J. 1989. Partial deletion of the human host range gene in the attenuated vaccinia virus MVA. *Arch Virol*, 105 (1-2):15-27.
- Ansari SA, Sattar SA, Springthorpe VS, Wells GA, Tostowaryk W. 1988. Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. *J Clin Microbiol*, 26 (8):1513-1518.
- Antoine G, Scheifflinger F, Dorner F, Falkner FG. 1998. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, 244 (2):365-396.
- Asper M, Hanrieder T, Quellmalz A, Mihranyan A. 2015. Removal of xenotropic murine leukemia virus by nanocellulose based filter paper. *Biologicals*, 43 (6):452-456.
- Bachrach HL, Schwerdt CE. 1952. Purification studies on Lansing poliomyelitis virus: pH stability, CNS extraction and butanol purification experiments. *J Immunol*, 69 (5):551-561.
- Banerjee S. 2013. Molecular dynamics study of self-agglomeration of charged fullerenes in solvents. *J Chem Phys*, 138 (4):044318.
- Barclay L, Park GW, Vega E, Hall A, Parashar U, Vinje J, Lopman B. 2014. Infection control for norovirus. *Clin Microbiol Infect*, 20 (8):731-740.
- Barker J, Vipond IB, Bloomfield SF. 2004. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect*, 58 (1):42-49.
- Barron AL, Olshevsky C, Cohen MM. 1970. Characteristics of the BGM line of cells from African green monkey kidney. Brief report. *Arch Gesamte Virusforsch*, 32 (4):389-392.
- Beauchamp TL, Childress JF. 2009. *Principles of Biomedical Ethics*. Oxford University Press.
- Belliot G, Lavaux A, Souihel D, Agnello D, Pothier P. 2008. Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants. *Appl Environ Microbiol*, 74 (10):3315-3318.
- Bharali DJ, Mousa SA. 2010. Emerging nanomedicines for early cancer detection and improved treatment: current perspective and future promise. *Pharmacol Ther*, 128 (2):324-335.
- Both GW, Sleight MJ, Cox NJ, Kendal AP. 1983. Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J Virol*, 48 (1):52-60.
- Bourdon JA, Halappanavar S, Saber AT, Jacobsen NR, Williams A, Wallin H, Vogel U, Yauk CL. 2012. Hepatic and pulmonary toxicogenomic profiles in mice intratracheally instilled with carbon black nanoparticles reveal pulmonary inflammation, acute phase response, and alterations in lipid homeostasis. *Toxicol Sci*, 127 (2):474-484.
- Buda S, Kopke K, Haas W. 2010. [Epidemiological characteristics of the influenza pandemic (H1N1) 2009 in Germany based on the mandatory notification of cases]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 53 (12):1223-1230.
- Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus LA, Vinje J. 2006. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J Food Prot*, 69 (11):2761-2765.
- Carroll MW, Moss B. 1997. Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology*, 238 (2):198-211.

- CEN European Committee for Standardisation/ Technical Committee 216 EN 14561:2006: Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative carrier test for the evaluation of bactericidal activity for instruments used in the medical area - Test method and requirements (phase 2, step 2).
- CEN European Committee for Standardisation/ Technical Committee 216 EN 1500:2013: Chemical disinfectants and antiseptics - Hygienic handrub - Test method and requirements (phase 2/step 2).
- CEN European Committee for Standardisation/ Technical Committee 216 EN 14476:2013+A1:2015: Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (Phase 2/Step 1).
- CEN European Committee for Standardisation/ Technical Committee 216 EN 16615:2015: Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative test method for the evaluation of bactericidal and yeasticidal activity on non-porous surfaces with mechanical action employing wipes in the medical area (4- field test) - Test method and requirements (phase 2, step 2).
- Charrel RN, de Chesse R, Decaudin A, De Micco P, de Lamballerie X. 2001. Evaluation of disinfectant efficacy against hepatitis C virus using a RT-PCR-based method. *J Hosp Infect*, 49 (2):129-134.
- Coleman CM, Frieman MB. 2014. Coronaviruses: important emerging human pathogens. *J Virol*, 88 (10):5209-5212.
- Conti M, Tazzari V, Baccini C, Pertici G, Serino LP, De Giorgi U. 2006. Anticancer drug delivery with nanoparticles. *In Vivo*, 20 (6A):697-701.
- Cullis AG, Canham LT, Calcott PDJ. 1997. The structural and luminescence properties of porous silicon. *Journal of Applied Physics*, 82 (3):909-965.
- Dahling DR, Berg G, Berman D. 1974. BGM, a continuous cell line more sensitive than primary rhesus and African green kidney cells for the recovery of viruses from water. *Health Lab Sci*, 11 (4):275-282.
- De Gusseme B, Sintubin L, Baert L, Thibo E, Hennebel T, Vermeulen G, Uyttendaele M, Verstraete W, Boon N. 2010. Biogenic silver for disinfection of water contaminated with viruses. *Appl Environ Microbiol*, 76 (4):1082-1087.
- Dianzani C, Zara GP, Maina G, Pettazzoni P, Pizzimenti S, Rossi F, Gigliotti CL, Ciamporcerio ES, Daga M, Barrera G. 2014. Drug delivery nanoparticles in skin cancers. *Biomed Res Int*, 2014:895986.
- Doerr HW, Gerlich WH. 2010. Adenoviridae. In: Doerr HW, Gerlich WH, Hrsg. *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 639-642.
- Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. 2001. Ultrafine particles. *Occup Environ Med*, 58 (3):211-216, 199.
- Drexler I, Heller K, Wahren B, Erfle V, Sutter G. 1998. Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J Gen Virol*, 79 (Pt 2):347-352.
- DVG /index.php?id=1789, zuletzt aufgerufen: 27.01.2016 <http://www.desinfektion-dvg.de>.
- DVV Memorandum zur Verwendung von Molekularsiebfiltrations-Säulen in der Desinfektionsmittelprüfung, /FachausKommis/FachausVirusdesinfektion/ViruzidiepfungMitteilungen/, zuletzt aufgerufen: 11.03.2016 www.dvv-ev.de.
- DVV /FachausKommis/FachausVirusdesinfektion, zuletzt aufgerufen: 11.11.2015 www.dvv-ev.de.
- Eickmann U. 2012. [Toxicity incidents by disinfectants]. *Aktuelle Urol*, 43 (5):347-359; quiz 360-341.

- Elder A, Oberdorster G. 2006. Translocation and effects of ultrafine particles outside of the lung. *Clin Occup Environ Med*, 5 (4):785-796.
- Eschrich W. 2010. Vergleichende Untersuchungen zur viruziden Wirkung von Desinfektionsmittel und Antiseptika gegenüber Poliomyelitis-Impfvirus und ECHO-Virus [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Fabry CM, Rosa-Calatrava M, Conway JF, Zubieta C, Cusack S, Ruigrok RW, Schoehn G. 2005. A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid. *EMBO J*, 24 (9):1645-1654.
- Fretz R, Schmid D, Jelovcan S, Tschertou R, Krassnitzer E, Schirmer M, Hell M, Allerberger F. 2009. An outbreak of norovirus gastroenteritis in an Austrian hospital, winter 2006-2007. *Wien Klin Wochenschr*, 121 (3-4):137-143.
- Gaikwad S, Ingle A, Gade A, Rai M, Falanga A, Incoronato N, Russo L, Galdiero S, Galdiero M. 2013. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *Int J Nanomedicine*, 8:4303-4314.
- Galdiero F. 1979. Adenovirus aggregation and preservation in extracellular environment. *Arch Virol*, 59 (1-2):99-105.
- Gelderblom HR/ Robert Koch-Institut /SharedDocs/Bilder/InfAZ/Pocken/EM_Tab_Pocken, zuletzt aufgerufen: 22.5.2016 www.rki.de.
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 51 (5):1417-1423.
- Glass RI, Parashar UD, Estes MK. 2009. Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med*, 361 (18):1776-1785.
- Grare M, Dibama HM, Lafosse S, Ribon A, Mourer M, Regnouf-de-Vains JB, Finance C, Duval RE. 2010. Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine. *Clin Microbiol Infect*, 16 (5):432-438.
- Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A. 1993. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell*, 75 (3):477-486.
- Greig JD, Lee MB. 2012. A review of nosocomial norovirus outbreaks: infection control interventions found effective. *Epidemiol Infect*, 140 (7):1151-1160.
- Gwinn MR, Vallyathan V. 2006. Nanoparticles: health effects--pros and cons. *Environ Health Perspect*, 114 (12):1818-1825.
- Haggstrom J, Balyozova D, Klabunde KJ, Marchin G. 2010. Virucidal properties of metal oxide nanoparticles and their halogen adducts. *Nanoscale*, 2 (4):529-534.
- Hartnack S, Essbauer S, Truyen U. 2008. Substitution of vaccinia virus Elstree by modified vaccinia virus Ankara to test the virucidal efficacy of chemical disinfectants. *Zoonoses Public Health*, 55 (2):99-105.
- He F, Joshi SB, Moore DS, Shinogle HE, Ohtake S, Lechuga-Ballesteros D, Martin RA, Truong-Le VL, Middaugh CR. 2010. Using spectroscopic and microscopic methods to probe the structural stability of human adenovirus type 4. *Hum Vaccin*, 6 (2):202-211.
- Herzog E, Byrne HJ, Davoren M, Casey A, Duschl A, Oostingh GJ. 2009. Dispersion medium modulates oxidative stress response of human lung epithelial cells upon exposure to carbon nanomaterial samples. *Toxicol Appl Pharmacol*, 236 (3):276-281.
- Hogle JM. 2002. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu Rev Microbiol*, 56:677-702.
- Horner C, Mawer D, Wilcox M. 2012. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? *J Antimicrob Chemother*, 67 (11):2547-2559.

- Hota B. 2004. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis*, 39 (8):1182-1189.
- Hoyer T/ Fraunhofer IKTS Hermsdorf. 2015a. "Im Projekt "AVIRO" hergestellte und der Uni Jena übergebene Pulverproben zur Messung der virusinaktivierenden Wirkung." [Pers. Mitteilung]
- Hoyer T/ Fraunhofer IKTS Hermsdorf. 2015b. "Die reproduzierbare Herstellung der Wolframcarbid-Partikel ist wahrscheinlich nicht mehr möglich." [Pers. Mitteilung]
- Hubbs AF, Mercer RR, Benkovic SA, Harkema J, Sriram K, Schwegler-Berry D, Goravanahally MP, Nurkiewicz TR, Castranova V, Sargent LM. 2011. Nanotoxicology--a pathologist's perspective. *Toxicol Pathol*, 39 (2):301-324.
- Hugbo PG. 1976. Additive and synergistic actions of equipotent admixtures of some antimicrobial agents. *Pharm Acta Helv*, 51 (10):284-288.
- ICTV 2014 Master Species List, zuletzt aufgerufen: 21.05.2016 <http://www.ictvonline.org/>.
- Isaacs A, Lindenmann J. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 147 (927):258-267.
- Jacobs L, Salazar AM, Herndon R, Reese PA, Freeman A, Jozefowicz R, Cuetter A, Husain F, Smith WA, Ekes R, et al. 1987. Intrathecally administered natural human fibroblast interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis. Results of a multicenter, double-blind study. *Arch Neurol*, 44 (6):589-595.
- Jilg W. 2010. Schutzimpfungen gegen Virusinfektionen. In: Doerr HW, Gerlich WH, Hrsg. *Medizinische Virologie. Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 139-140.
- Johnston MD, Hanlon GW, Denyer SP, Lambert RJ. 2003. Membrane damage to bacteria caused by single and combined biocides. *J Appl Microbiol*, 94 (6):1015-1023.
- Jursch CA, Gerlich WH, Glebe D, Schaefer S, Marie O, Thraenhart O. 2002. Molecular approaches to validate disinfectants against human hepatitis B virus. *Med Microbiol Immunol*, 190 (4):189-197.
- Kaaden O-R, Mahnel H. 1993. Allgemeine Virologie. Messung der Infektiosität. In: Rolle M, Mayr A, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen, Agrarwissenschaftler und Interessierte aus benachbarten Fachgebieten*. 6. Aufl. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 207-210.
- Kärber G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 162 (4):480-483.
- Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HWt. 2003. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science*, 299 (5612):1575-1578.
- Kayser FH, Böttger EC. 2010. Epidemiologie und Hygiene. In: Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P, Hrsg. *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. 12. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 45-74.
- Klein M, Deforest A. 1983. Principles of viral inactivity. In: Block SS, Hrsg. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. 3. Aufl. Philadelphia: Lea & Febiger, 422-434.
- Knowles NJ, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Lindberg AM, Pallansch MA, Palmenberg AC, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T, Zell R. 2011. Family Picornaviridae. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz E, Hrsg. *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York u.a.: Elsevier Academic Press, 855-880.
- Koper OB, Klabunde JS, Marchin GL, Klabunde KJ, Stoimenov P, Bohra L. 2002. Nanoscale powders and formulations with biocidal activity toward spores and vegetative cells of bacillus species, viruses, and toxins. *Curr Microbiol*, 44 (1):49-55.

- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27 (2-3):95-125.
- Lambert RJ, Johnston MD, Hanlon GW, Denyer SP. 2003. Theory of antimicrobial combinations: biocide mixtures - synergy or addition? *J Appl Microbiol*, 94 (4):747-759.
- Lasaro MO, Ertl HC. 2009. New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Mol Ther*, 17 (8):1333-1339.
- Lee BY, Wettstein ZS, McGlone SM, Bailey RR, Umscheid CA, Smith KJ, Muder RR. 2011. Economic value of norovirus outbreak control measures in healthcare settings. *Clin Microbiol Infect*, 17 (4):640-646.
- Lefkowitz EJ, Wang C, Upton C. 2006. Poxviruses: past, present and future. *Virus Res*, 117 (1):105-118.
- Leggett MJ, Schwarz JS, Burke PA, McDonnell G, Denyer SP, Maillard JY. 2015. Mechanism of Sporicidal Activity for the Synergistic Combination of Peracetic Acid and Hydrogen Peroxide. *Appl Environ Microbiol*, 82 (4):1035-1039.
- Liuzzi G, Chirianni A, Clementi M, Bagnarelli P, Valenza A, Cataldo PT, Piazza M. 1996. Analysis of HIV-1 load in blood, semen and saliva: evidence for different viral compartments in a cross-sectional and longitudinal study. *AIDS*, 10 (14):51-56.
- Loosli F, Vitorazi L, Berret JF, Stoll S. 2015. Towards a better understanding on agglomeration mechanisms and thermodynamic properties of TiO₂ nanoparticles interacting with natural organic matter. *Water Res*, 80:139-148.
- Lopman BA, Reacher MH, Vipond IB, Hill D, Perry C, Halladay T, Brown DW, Edmunds WJ, Sarangi J. 2004. Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002-2003. *Emerg Infect Dis*, 10 (10):1827-1834.
- Luo YH, Chang LW, Lin P. 2015. Metal-Based Nanoparticles and the Immune System: Activation, Inflammation, and Potential Applications. *Biomed Res Int*, 2015:143720.
- Macpherson I, Stoker M. 1962. Polyoma transformation of hamster cell clones--an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*, 16:147-151.
- Magulski T, Paulmann D, Bischoff B, Becker B, Steinmann E, Steinmann J, Goroncy-Bernes P, Steinmann J. 2009. Inactivation of murine norovirus by chemical biocides on stainless steel. *BMC Infect Dis*, 9:107.
- Mayr A, Hochstein-Mintzel V, Stickl H. 1975. Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. *Infection*, 3:6-14.
- McDonnell G, Russell AD. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev*, 12 (1):147-179.
- McPherson MJ, Moller SG. 2000. PCR - The Basics from background to bench. New York: Springer-Verlag, 108-109.
- Meyer H, Sutter G, Mayr A. 1991. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol*, 72 (Pt 5):1031-1038.
- Mielke M, Pauli G, Schreier E, Schwebke I, Niedrig M. 2004. Prüfung und Deklaration der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Viren. Empfehlung Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz, 47:62-66.
- Modrow S, Falke D, Truyen U. 2003. Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom. Adenoviren. In: Modrow S, Falke D, Truyen U, Hrsg. *Molekulare Virologie*. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 514-518.
- Moller L, Schunadel L, Nitsche A, Schwebke I, Hanisch M, Laue M. 2015. Evaluation of virus inactivation by formaldehyde to enhance biosafety of diagnostic electron microscopy. *Viruses*, 7 (2):666-679.

- Morace G, Bellamy K, Maris P, Steinmann J. 2009. Evaluation of the virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics: the European point of view. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 30 (3):301-302; author reply 302-304.
- Mormann S, Heissenberg C, Pfannebecker J, Becker B. 2015. Tenacity of human norovirus and the surrogates feline calicivirus and murine norovirus during long-term storage on common nonporous food contact surfaces. *J Food Prot*, 78 (1):224-229.
- Moss B. 1996. Poxviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley, PM et al., Hrsg. *Fields Virology*. 3. Aufl. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers
- Moss B, Shisler JL. 2001. Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes. *Semin Immunol*, 13 (1):59-66.
- Mu L, Sprando RL. 2010. Application of Nanotechnology in Cosmetics. *Pharm Res*, 27:1746-1749.
- Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater*, 8 (7):543-557.
- NNI /nanotech-101/what/defintion, zuletzt aufgerufen: 22.5.2016 www.nano.gov.
- Olson NH, Kolatkar PR, Oliveira MA, Cheng RH, Greve JM, McClelland A, Baker TS, Rossmann MG. 1993. Structure of a human rhinovirus complexed with its receptor molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (2):507-511.
- Operskalski EA, Mosley JW, Tobler LH, Fiebig EW, Nowicki MJ, Mimms LT, Gallarda J, Phelps BH, Busch MP, Transfusion-Transmitted Viruses S, Retrovirus Epidemiology Donor S. 2003. HCV viral load in anti-HCV-reactive donors and infectivity for their recipients. *Transfusion*, 43 (10):1433-1441.
- Osminkina LA, Sivakov VA, Mysov GA, Georgobiani VA, Natashina Ucapital A C, Talkenberg F, Solovyev VV, Kudryavtsev AA, Timoshenko VY. 2014a. Nanoparticles prepared from porous silicon nanowires for bio-imaging and sonodynamic therapy. *Nanoscale Res Lett*, 9 (1):463.
- Osminkina LA, Yu Timoshenko V, Shilovsky IP, Kornilaeva GV, Shevchenko SN, Gongalsky MB, Tamarov KP, Abramchuk SS, Nikiforov VN, Khaitov MR, Karamov EV. 2014b. Porous silicon nanoparticles as scavengers of hazardous viruses. *J Nanopart Res*, 16:2430.
- Paulmann D, Steinmann J, Becker B, Bischoff B, Steinmann E, Steinmann J. 2011. Virucidal activity of different alcohols against murine norovirus, a surrogate of human norovirus. *J Hosp Infect*, 79 (4):378-379.
- Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY, group Ss. 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 361 (9366):1319-1325.
- Porter DW, Hubbs AF, Mercer RR, Wu N, Wolfarth MG, Sriram K, Leonard S, Battelli L, Schwegler-Berry D, Friend S, Andrew M, Chen BT, Tsuruoka S, Endo M, Castranova V. 2010. Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology*, 269 (2-3):136-147.
- Prag G, Falk-Brynhildsen K, Jacobsson S, Hellmark B, Unemo M, Soderquist B. 2014. Decreased susceptibility to chlorhexidine and prevalence of disinfectant resistance genes among clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *APMIS*, 122 (10):961-967.
- Prince HN, Prince DL. 2001. Principles of viral control and transmission. In: Block SS, Hrsg. *Disinfection, sterilisation and preservation*. 5. Aufl. Philadelphia: Lea & Febiger, 543-571.

- Prince HN, Prince DL, Prince RN. 1991. Principles of viral control and transmission. In: Block SS, Hrsg. Disinfection, Sterilization, and Preservation. 4. Aufl. Philadelphia: Lea & Febiger, 411-444.
- Quinn PJ. 1992. Mechanisms of viral inactivation. In: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GA, Hrsg. Disinfection, preservation and sterilization. 2. Aufl. Oxford u.a.: Blackwell Scientific Publications, 154-156.
- Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, Meehan MO, Lutalo T, Gray RH. 2000. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. N Engl J Med, 342 (13):921-929.
- Rabenau HF, Schwebke I. 2010. Hygiene und Desinfektion zur Bekämpfung von Viren. In: Doerr H W, Gerlich W H, Hrsg. Medizinische Virologie. Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 168-183.
- Rabenau HF, Rapp I, Steinmann J. 2010. Can vaccinia virus be replaced by MVA virus for testing virucidal activity of chemical disinfectants? BMC Infect Dis, 10:185.
- Rabenau HF, Steinmann J, Rapp I, Schwebke I, Eggers M. 2014. Evaluation of a virucidal quantitative carrier test for surface disinfectants. PLoS One, 9 (1):e86128.
- Rabenau HF, Schwebke I, Steinmann J, Eggers M, Rapp I, Neumann-Haefelin D. 2012. Quantitative Prüfung der viruziden Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel auf nicht-porösen Oberflächen. Hyg Med, 37 (3):78-85.
- Rabenau HF, Schwebke I, Blümel J, Eggers M, Glebe D, Rapp I, Sauerbrei A, Steinmann E, Steinmann J, Willkommen H, Wutzler P, (Mitglieder des Fachausschuss "Virusdesinfektion" der DVV Homburg, Deutschland). 2015. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin (Fassung vom 1. Dezember 2014). Bundesgesundheitsbl, 58:493-504.
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. Cell, 15 (1):261-267.
- Reybrouck G. 1992. The assessment of the bactericidal activity of surface disinfectants. V. Correlation of the tests with practice. Zentralbl Hyg Umweltmed, 192 (5):438-446.
- Robert Koch-Institut. 2015. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2014, Berlin.
- Rohayem J, Rethwilm A. 2010. Caliciviren. In: Doerr H W, Gerlich W H, Hrsg. Medizinische Virologie. Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 499-500.
- Rohländer D/ Fraunhofer IKTS Hermsdorf. 2015. "WC-Pulver." [Pers. Mitteilung]
- Rossmann MG. 2002. Picornavirus structure overview. In: Semler B L, Wimmer E, Editors. Molecular Biology of Picornaviruses. Washington DC: ASM Press: 27-39.
- Rouquerol J, Avnir D, Fairbridge CW, Everett DH, Haynes JM, Pernicone N, Ramsay JDF, Sing KSW, Unger KK. 1994. Recommendations for the characterization of porous solids (Technical Report). Pure Appl Chem, 66 (8):1739-1758.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med, 84 (3):570-573.
- Rueckert RR. 1996. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley, PM et al., Hrsg. Fields Virology. 3. Aufl. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.

- Rutala WA, Peacock JE, Gergen MF, Sobsey MD, Weber DJ. 2006. Efficacy of hospital germicides against adenovirus 8, a common cause of epidemic keratoconjunctivitis in health care facilities. *Antimicrob Agents Chemother*, 50 (4):1419-1424.
- Rux JJ, Burnett RM. 2004. Adenovirus structure. *Hum Gene Ther*, 15 (12):1167-1176.
- Ryman-Rasmussen JP, Tewksbury EW, Moss OR, Cesta MF, Wong BA, Bonner JC. 2009. Inhaled multiwalled carbon nanotubes potentiate airway fibrosis in murine allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40 (3):349-358.
- Sabin AB. 1985. Oral poliovirus vaccine: history of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. *J Infect Dis*, 151 (3):420-436.
- San Martin C. 2012. Latest insights on adenovirus structure and assembly. *Viruses*, 4 (5):847-877.
- Sanvicens N, Marco MP. 2008. Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol*, 26 (8):425-433.
- Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. 2013. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnology*, 11:26.
- Saputra D, Yoon JH, Park H, Heo Y, Yang H, Lee EJ, Lee S, Song CW, Lee K. 2014. Inhalation of carbon black nanoparticles aggravates pulmonary inflammation in mice. *Toxicol Res*, 30 (2):83-90.
- Sauerbrei A, Sehr K, Eichhorn U, Reimer K, Wutzler P. 2004a. Inactivation of human adenovirus genome by different groups of disinfectants. *J Hosp Infect*, 57 (1):67-72.
- Sauerbrei A, Schacke M, Gluck B, Egerer R, Wutzler P. 2006. Validation of biocides against duck hepatitis B virus as a surrogate virus for human hepatitis B virus. *J Hosp Infect*, 64 (4):358-365.
- Sauerbrei A, Sehr K, Brandstadt A, Heim A, Reimer K, Wutzler P. 2004b. Sensitivity of human adenoviruses to different groups of chemical biocides. *J Hosp Infect*, 57 (1):59-66.
- Sauermann D, Barke HD. 1997. Einlagerungsmischkristalle. In: Sauermann D, Barke HD. *Chemie für Quereinsteiger. Band 2 - Metalle und Legierungen*. Münster: Schöningh Verlag, 79-88
- Schwebke I, Rabenau HF. 2012. Aktueller Stand zur Viruzidieprüfung - ein Überblick. *Hyg Med*, 37 (7/8):178-182.
- Seet BT, Johnston JB, Brunetti CR, Barrett JW, Everett H, Cameron C, Sypula J, Nazarian SH, Lucas A, McFadden G. 2003. Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol*, 21:377-423.
- Shears P. 2007. Poverty and infection in the developing world: healthcare-related infections and infection control in the tropics. *J Hosp Infect*, 67 (3):217-224.
- Shears P, O'Dempsey TJ. 2015. Ebola virus disease in Africa: epidemiology and nosocomial transmission. *J Hosp Infect*, 90 (1):1-9.
- Shiver JW, Fu TM, Chen L, Casimiro DR, Davies ME, Evans RK, Zhang ZQ, Simon AJ, Trigona WL, Dubey SA, Huang L, Harris VA, Long RS, Liang X, Handt L, Schleif WA, Zhu L, Freed DC, Persaud NV, Guan L, Punt KS, Tang A, Chen M, Wilson KA, Collins KB, Heidecker GJ, Fernandez VR, Perry HC, Joyce JG, Grimm KM, Cook JC, Keller PM, Kresock DS, Mach H, Troutman RD, Isopi LA, Williams DM, Xu Z, Bohannon KE, Volkin DB, Montefiori DC, Miura A, Krivulka GR, Lifton MA, Kuroda MJ, Schmitz JE, Letvin NL, Caulfield MJ, Bett AJ, Youil R, Kaslow DC, Emini EA. 2002. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature*, 415 (6869):331-335.
- Skebo JE, Grabinski CM, Schrand AM, Schlager JJ, Hussain SM. 2007. Assessment of metal nanoparticle agglomeration, uptake, and interaction using high-illuminating system. *Int J Toxicol*, 26 (2):135-141.

- Smita S, Gupta SK, Bartonova A, Dusinska M, Gutleb AC, Rahman Q. 2012. Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach. *Environ Health*, 11 Suppl 1:S13.
- Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, Ma SK, Cheung CL, Raghwani J, Bhatt S, Peiris JS, Guan Y, Rambaut A. 2009. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*, 459 (7250):1122-1125.
- Spearman C. 1908. THE METHOD OF 'RIGHT AND WRONG CASES' ('CONSTANT STIMULI') WITHOUT GAUSS'S FORMULAE. *British Journal of Psychology*, 1904-1920, 2 (3):227-242.
- Statistisches Bundesamt D /DE/ZahlenFakten/LaenderRegionen/Internationales/Thema/Tabellen/Basistabelle_BIPproKopf, zuletzt aufgerufen: 22.05.2016 www.destatis.de.
- Steinmann J. 2004. Surrogate viruses for testing virucidal efficacy of chemical disinfectants. *J Hosp Infect*, 56 Suppl 2:S49-54.
- Sutton TC, Subbarao K. 2015. Development of animal models against emerging coronaviruses: From SARS to MERS coronavirus. *Virology*, 479-480C:247-258.
- Thraenhart O. 2002. Desinfektion, Sterilisation. In: Doerr HW, Gerlich WH, Hrsg. *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder*, 1. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 116-139.
- Tourinho PS, van Gestel CA, Lofts S, Svendsen C, Soares AM, Loureiro S. 2012. Metal-based nanoparticles in soil: fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environ Toxicol Chem*, 31 (8):1679-1692.
- Tyler R, Ayliffe GA, Bradley C. 1990. Virucidal activity of disinfectants: studies with the poliovirus. *J Hosp Infect*, 15 (4):339-345.
- Urban DA, Rodriguez-Lorenzo L, Balog S, Kinnear C, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A. 2015. Plasmonic nanoparticles and their characterization in physiological fluids. *Colloids Surf B Biointerfaces*.
- Valot S, Edert D, Le Faou A. 2000. A simple method for the in vitro study of the virucidal activity of disinfectants. *J Virol Methods*, 86 (1):21-24.
- van Klingeren B. 1995. Disinfectant testing on surfaces. *J Hosp Infect*, 30 Suppl:397-408.
- van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB. 2000. Family Adenoviridae. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB, Hrsg. *Virus Taxonomy: 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego u.a.: Academic Press, 227-234.
- von Rheinbaben F. 2007. Zur Desinfektion von Pockenviren. *aseptica*, 13 (1):12-13.
- von Rheinbaben F, Wolff M. 2002. *Handbuch der viruswirksamen Desinfektion.*: Springer-Verlag.
- von Rheinbaben F, Gebel J, Exner M, Schmidt A. 2007. Environmental resistance, disinfection and sterilization of poxviruses. In: Mercer A A, Schmidt A, Weber O, Editors. *Poxviruses*. Basel: Birkhäuser Verlag, 397-405.
- Wallhäußer KH. 1995. Gesichtspunkte zur Auswahl des Desinfektionsverfahrens. In: Wallhäußer KH, Hrsg. *Praxis der Sterilisation. Desinfektion - Konservierung. Keimidentifizierung - Betriebshygiene*. 5. Aufl. Stuttgart u.a.: Georg Thieme Verlag, 391-395.
- Weber DJ, Rutala WA. 2013. Self-disinfecting surfaces: review of current methodologies and future prospects. *Am J Infect Control*, 41 (5 Suppl):S31-35.
- Weber DJ, Anderson D, Rutala WA. 2013. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr Opin Infect Dis*, 26 (4):338-344.

- Wetz K, Habermehl KO. 1979. Topographical studies on poliovirus capsid proteins by chemical modification and cross-linking with bifunctional reagents. *J Gen Virol*, 44 (2):525-534.
- Wetz K, Habermehl KO. 1982. Specific cross-linking of capsid proteins to virus RNA by ultraviolet irradiation of poliovirus. *J Gen Virol*, 59 (Pt 2):397-401.
- WHO /ebola/current-situation/ebola-situation-report-30-march-2016, zuletzt aufgerufen: 22.5.2016 www.who.int.
- Wobus CE, Thackray LB, Virgin HWt. 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol*, 80 (11):5104-5112.
- Yilmaz A, Kaleta EF. 2003. Investigations on suitability of different materials for carriers to be used for virucidal testing of chemical disinfectants in the veterinary field. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 50 (9):461-465.
- Zhu J, Liao L, Zhu L, Zhang P, Guo K, Kong J, Ji C, Liu B. 2013. Size-dependent cellular uptake efficiency, mechanism, and cytotoxicity of silica nanoparticles toward HeLa cells. *Talanta*, 107:408-415.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*, 32 (12):e103.

Danksagung

Diese Seite widme ich denjenigen, die mich in der Zeit meiner Dissertation begleitet und tagtäglich zu deren Gelingen beigetragen haben. Ich möchte mich hiermit bedanken

besonders bei Herrn Prof. Dr. med. habil. A. Sauerbrei für die Überlassung des Themas sowie für Leitfaden und Struktur, die er mir bei der Bearbeitung gab. Außerdem bin ich dankbar, dass er mir als Direktor des Instituts für Virologie und Antivirale Therapie eine Promotion ermöglicht und mir dafür benötigte Mittel zur Verfügung gestellt hat.

bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. R. Zell, der mir als Betreuer zur Seite stand und sich dabei stets Zeit für mich nahm. Ich danke ihm für sein Engagement sowie für anregende und interessante Gespräche, die oft auch über das Fachgebiet der Virologie hinausgingen. Er trägt einen großen Anteil am gelungenen Abschluss dieser Arbeit, da er mich stets zu motivieren wusste und dabei immer den richtigen Ton fand.

bei Herrn Dr. rer. nat. V. Sivakov vom IPHT Jena und Herrn Dr. rer. nat. T. Hoyer vom IKTS Hermsdorf für die Bereitstellung der Testsubstanzen.

bei Frau M. Müller, die mich im Labor mit großer Geduld und viel Ruhe eingearbeitet hat. In ihrer fürsorglichen Art war sie mir nicht nur in Praxisfragen eine kompetente Hilfe, sondern auch als emotionale Unterstützung.

bei Herrn Dr. rer. nat. M. Schacke für sämtliche Zuarbeiten im Rahmen der Zellkultur sowie bei Frau M. Hüttig, die immer für ausreichend Versuchsmaterial gesorgt hat. Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des Instituts, dass sie mich herzlich inmitten ihrer Gemeinschaft aufgenommen haben.

bei Frau Dr.-Ing. H. Hoyer vom Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation für die fachliche Beratung im Rahmen der statistischen Auswertung.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. rer. nat. R. Zell und Prof. Dr. med. habil. A. Sauerbrei vom Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena sowie Dr.-Ing. H. Hoyer vom Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Universitätsklinikums Jena,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

Jena, 11.12.2018